

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



**Využití chemoenzymových metod pro preparativní
separaci diastereoisomerů silybinu**

**Chemoenzymatic separation of diastereoisomers of
silybin**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Purchartová

Školitel: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Ing. Radek Gažák, PhD.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a Ing. Radka Gažáka, PhD. a všechny prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Kateřina Purchartová

ABSTRACT

Silybin is major component of silymarin isolated from seeds of the milk thistle (*Silybum marianum*). This compound is widely used in human medicine against liver disorders and as a protectant against a number of hepatotoxins. It also exhibits other interesting activities as anticancer and chemoprotective, dermatoprotective and also hypocholesterolemic effects. Natural silybin is a nearly equimolar mixture of two diastereoisomers, silybin A and silybin B, whose analytical separation is quite feasible, but preparative separation is extremely complicated. The aim of this work was to find suitable method leading to separation of both silybin diastereoisomers. A library of hydrolases (lipases, esterases and proteases) was tested for their diastereoisomeric discrimination of the selective alcoholysis of 23-*O*-acetylsilybins. Novozym 435 (lipase B from *Candida antarctica* immobilized on acrylic resin) proved to be the most suitable enzyme for the preparative production of both optically pure silybin A and B by enzymatic hydrolysis. Under the optimized conditions, silybin A was obtained in 42 % yield and 97 % purity while silybin B was obtained in 67 % yield and 99 % purity.

Covalent modifications of Novozym 435 (acetylation, succinylation, and hydroxyethylamidation), which should lead to improvement of diastereoselectivity, were tested, but they have not resulted in increased diastereoselectivity. However, acetylated Novozym 435 exhibited similar activity and selectivity as the unmodified enzyme.

The galactosides of silybin were prepared and the ability of β -D-galactosidase to discriminate both diastereoisomers was tested. Although the prepared substrate was hydrolysed very rapidly and with high conversion, the enzyme failed to show any diastereopreference.

A new and easy way to prepare selectively protected derivatives of silybin was found. Using lipase AK and peracetylated silybin as a substrate, two products were obtained - 3,5,20,23-tetra-*O*-acetyl-silybin and 3,20,23-tri-*O*-acetyl-silybin. Their conventional preparation is not feasible and they can be used as starting materials in further chemical synthesis.

An important task for the future is to prepare new derivatives of silybin starting from its optically pure stereoisomers and determine their biological activity, focusing on the possibility to use them subsequently in the medicine.

Diploma thesis is written in Czech.

Ráda bych poděkovala své školitelce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání tématu a cenné rady při vypracování této práce. Dále děkuji Ing. Radkovi Gažákovi, PhD., mému konzultantovi, za odborné vedení, četné rady a připomínky, za všestrannou pomoc a obětavou spolupráci při řešení této diplomové práce, kolegům z Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR, v.v.i., za jejich pomoc a cenné rady, zejména Prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. za možnost vypracovat tuto práci v jeho laboratoři, Mgr. Davidu Biedermannovi, PhD. a Ing. Petru Marholovi za HPLC analýzy a všestrannou pomoc při jejich měření, Ing. Petru Sedmerovi, CSc. a Ing. Markovi Kuzmovi, PhD. z MBÚ AV ČR, v.v.i. za měření a interpretaci NMR spekter, RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. za měření a interpretaci MS spekter.

Dále bych chtěla poděkovat kolegům z laboratoře Chemie molekulárního rozpoznávání (C.N.R., Milano), Dr. Daniele Monti a Prof. Sergio Rivovi, za možnost vypracovat část práce v jejich laboratoři. V neposlední řadě mé poděkování patří rodičům a přátelům, kteří mi byli oporou při sepisování této práce.

Tato práce byla podporována grantem GA AV ČR č. KJB400200701.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD.....	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Ostropestřec mariánský (<i>Silybum marianum</i>).....	10
2.2 Složení silymarinu.....	10
2.3 Biosyntéza silybinu a jeho chemická syntéza	12
2.4 Semisyntetické deriváty silybinu	16
2.5 Biologické účinky silybinu (silymarinu)	16
2.6 Biologické účinky čistých diastereoisomerů silybinu	18
2.7 Diastereoisomery silybinu a jejich separace.....	19
2.8 Hydrolasy.....	21
2.8.1 Glykosidasy	21
2.8.2 Lipasy.....	22
2.8.3 Regioselektivita lipas a její využití pro přípravu esterů flavonoidů	32
3 CÍLE PRÁCE	34
4 MATERIÁL A METODY.....	35
4.1 Použité chemikálie	35
Rozpouštědla.....	35
4.2 Použité přístroje a metody	37
4.2.1 Použité metody	37
4.2.2 Tenkovrstvá chromatografie	37
4.2.3 Preparativní sloupcová chromatografie na silikagelu	37
4.2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	37
4.2.5 Nukleární magnetická rezonance (NMR)	38
4.2.6 Hmotnostní spektrometrie (MS)	40
4.3 Využití glykosidas pro separaci diastereoisomerů silybinu	41
4.3.1 Syntéza derivátů silybinu.....	41
4.3.2 Využití β -D-galaktosidas pro diskriminaci diastereoisomerů silybinu	42

4.4	Využití lipas pro separaci diastereoisomerů silybinu	42
4.4.1	Příprava esterů silybinu	42
4.4.2	Stanovení optimálního množství enzymu (Novozym 435) pro hydrolýzu 23- <i>O</i> -acetyl-silybinu.....	44
4.4.3	Kinetika hydrolýzy 23- <i>O</i> -acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 v TBME a toluenu	44
4.4.4	Příprava opticky čistého silybinu A v preparativním měřítku	44
4.4.5	Příprava opticky čistého silybinu B v preparativním měřítku	45
4.4.6	Kovalentní modifikace Novozymu 435	46
4.4.7	Zhodnocení efektu kovalentních modifikací Novozymu 435 na diastereosektivitu hydrolýzy 23- <i>O</i> -acetyl-silybinu.....	47
4.4.8	Využití 3,5,7,20,23-penta- <i>O</i> -acetyl-silybinu jako substrátu pro určení regioselektivity lipas	47
5	VÝSLEDKY.....	50
5.1	Využití β-D-galaktosidasy pro diskriminaci diastereoisomerů silybinu	50
5.2	Využití lipas pro separaci diastereoisomerů silybinu.....	51
5.2.1	Stanovení optimálního množství enzymu (Novozym 435) pro hydrolýzu 23- <i>O</i> -acetyl-silybinu.....	51
5.2.2	Kinetika hydrolýzy 23- <i>O</i> -acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 v TBME	52
5.2.3	Kinetika hydrolýzy 23- <i>O</i> -acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 v toluenu	54
5.2.4	Příprava opticky čistého silybinu A a B v preparativním měřítku	55
5.2.5	Kovalentní modifikace Novozymu 435	56
5.2.6	Využití 3,5,7,20,23-penta- <i>O</i> -acetyl-silybinu jako substrátu pro určení regioselektivity lipas	59
6	DISKUZE	61
7	ZÁVĚR.....	70
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	71

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2D NMR	Dvourozměrná NMR
Ac	Acetyl
CD	Cirkulární Dichroismus
COSY	Correlation Spectroscopy
de	Diastereoisomeric excess
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	<i>N,N</i> -difenyl- <i>N'</i> -pikrylhydrazyllový radikál
ee	Enantiomeric excess
ekv.	Ekvivalent
ESI MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
Et	Ethyl
GSH	Glutathion
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOM2DJ	Spektroskopie s rozlišením interakčních konstant
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
LDL	Low Density Lipoproteins
MALDI MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometer
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární Magnetická Rezonance
NOE	Nuclear Overhauser effect
ppb	Part per bilion
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser effect spectroscopy
ROS	Reactive Oxygen Species
TBME	<i>terc</i> -butylmethylether

TFA	Kyselina trifluoroctová
TLC	Thin Layer Chromatography
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time of Flight (MS detektor)

1 ÚVOD

Flavonolignan silybin je majoritní složkou silymarinu, směsi polyfenolických látek izolovaných ze semen ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*). Kromě silybinu obsahuje silymarin také další flavonolignany jako isosilybin, silydianin, silychristin, 2,3-dehydrosilybin, flavonoidy taxifolin a kvercetin a směs polymerních fenolických látek.^[1]

Biologická dostupnost a s ní související terapeutická účinnost silybinu je omezena jeho nízkou rozpustností ve vodě. Silybin vykazuje celou řadu biologických aktivit. Využívá se především jako hepatoprotektivum.^[2] Má významné antioxidační vlastnosti, ovlivňuje však také vylučování toxických látek z organismu a uplatňuje se při doplňkové léčbě při chemoterapii nádorových onemocnění.^[1]

Přírodní silybin není jediné chemické individuum, ale je to směs dvou stereoisomerů (silybinu A a silybinu B), které jsou preparativně prakticky nedělitelné a lze je separovat pouze v analytickém měřítku pomocí HPLC. Kromě tří dosud existujících prací^[3,4,5] byly zatím veškeré biologické studie silybinu prováděny se směsí obou jeho diastereoisomerů.

Vývoj metody vedoucí k separaci obou isomerů silybinu v preparativním měřítku je nezbytným předpokladem k dalšímu pokroku v této oblasti, především studiu biologických aktivit na molekulární úrovni. Výsledky nedávných studií dokládají, že diastereoisomery silybinu mají odlišnou biologickou aktivitu. Jako příklad lze uvést estrogenní aktivitu - zatímco silybin A estrogenní účinky nevykazuje, silybin B je poměrně velmi aktivní.^[4]

Novou metodou, která by mohla poskytnout významnější množství čistých diastereoisomerů silybinu, je využití enzymů schopných selektivní diskriminace vhodně modifikovaného silybinu (směsi tvořené stejným derivátem silybinu A a B). Mírné podmínky enzymových reakcí jsou výhodné také proto, že při nich prakticky nedochází k nežádoucím degradačním a izomerizačním reakcím silybinu.

Tato práce navazuje na práci Ing. Radka Gažáka, PhD. (Selektivní modifikace silybinu - disertační práce), Ing. Lucie Živné (Selektivní esterifikace silybinu - diplomová práce) a Bc. Kateřiny Purchartové (Antioxidační aktivita nových derivátů silybinu - bakalářská práce).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*)

Zdrojem silybinu je ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*, (L.) Gaertn.), který byl pro své léčivé účinky využíván již ve starověku. Tato rostlina je původem ze Středomoří, od 70. let se však pěstuje i v České republice. Ostropestřec mariánský (obr. 1)



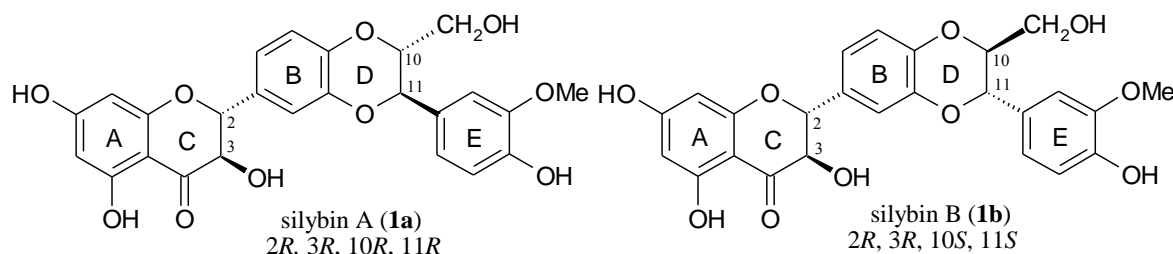
Obr. 1: Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*)

patří do čeledi *Asteraceae* (hvězdnicovité). Semena ostropestřce obsahují směs flavonolignanů, flavonoidy, lipidy, sacharidy, saponiny a vitaminy.^[1] Extrakcí částečně odtučněných semen acetonem (případně ethanolem, methanolem nebo ethyl-acetátem) se získává surový extrakt (tzv. silymarin)^[6] obsahující flavonolignany (včetně silybinu) a polymerní fenolické látky. Acetonový extrakt se zahustí ve vakuu a zbývající lipidy se odstraní vytřepáním hexanem. Při vytřepávání zároveň dochází k vysrážení surového silybinu. Čistý silybin se získává ze silymarinu krystalizací z ethanolu s přídavkem 10 % vody a přečištěním rekrystalizací z absolutního ethanolu.

2.2 Složení silymarinu

Základy nomenklatury flavonolignanů izolovaných ze *S. marianum* byly položeny v roce 1974, kdy byl navržen název silymarin pro kompletní směs těchto flavonoidů a názvy silybin, silydianin a silychristin pro majoritní komponenty této směsi.^[7,8] Název silymarin byl do té doby používán jako synonymum pro silybin. Přesné chemické složení silymarinu zatím není zcela známé, neboť kromě frakce tvořené flavonolignany (70 – 80 %) obsahuje také frakci polymerních fenolických sloučenin (20 – 30 %). V závislosti na kultivaru *S. marianum* se podíl těchto frakcí v extraktu mění. Hlavní složkou silymarinu je silybin^[1] (přes 30 %), který je tvořen směsí dvou diastereoisomerů A a B zastoupených v poměru přibližně 1:1 (obr. 2, str. 11). Silybin A (**1a**) má absolutní konfiguraci 2*R*, 3*R*, 10*R*, 11*R* a jeho systematický název je (2*R*,3*R*)-2-[(2*R*,3*R*)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-

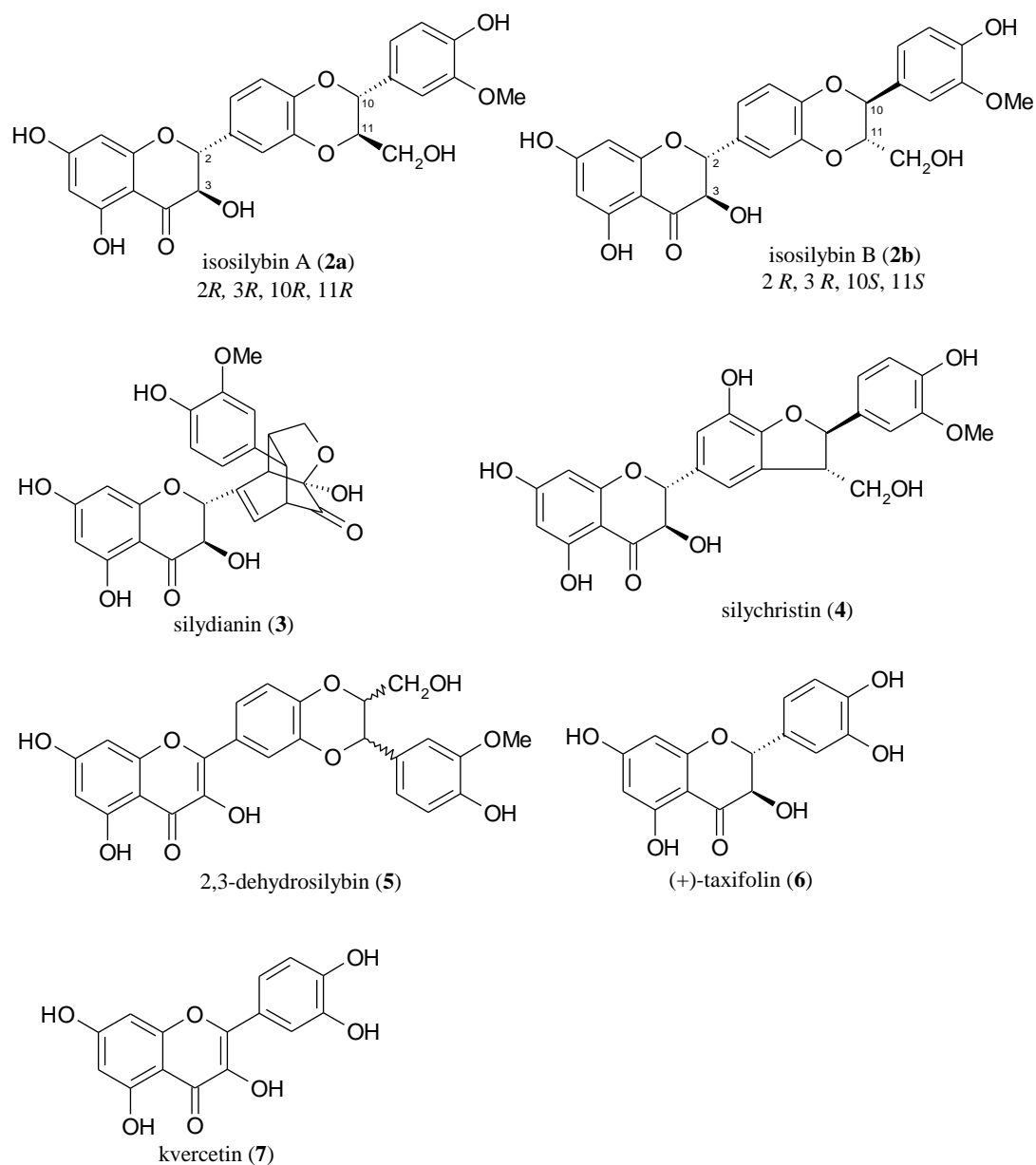
4*H*-1-benzopyran-4-on, silybin B (**1b**) má absolutní konfiguraci 2*R*, 3*R*, 10*S*, 11*S* a systematický název (2*R*,3*R*)-2-[(2*S*,3*S*)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-4*H*-1-benzopyran-4-on.^[6,9]



Obr. 2: Struktura diastereoisomerů silybinu a jejich absolutní konfigurace (číslování použité zde je odlišné od číslování používaného při tvorbě systematických názvů)

Další složky silymarinu jsou flavonolignany isosilybin (**2**), silydianin (**3**), silychristin (**4**) a 2,3-dehydrosilybin (**5**) a flavonoidy (+)-taxifolin (**6**) a kvercetin (**7**) (obr. 3, str. 12).

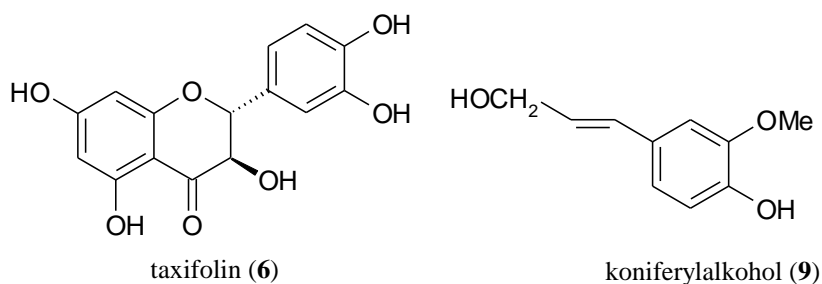
Stereochemie flavonolignanů silymarinu byla objasněna pomocí CD-spekter,^[6] NMR spekter a rentgenostrukturní analýzy. Tento typ látek má chirální centra na uhlících C-2, C-3 (kruh C) a C-10, C-11 (kruh D).



Obr. 3: Další složky silymarinu

2.3 Biosyntéza silybinu a jeho chemická syntéza

Pro strukturu flavonoidů je charakteristický fenylchromanonový skelet s navázanými hydroxylovými skupinami. Flavonolignany vznikají kondenzací flavonoidu taxifolinu (**6**) s koniferylalkoholem (**9**) (obr. 4, str. 13),^[10,11] od čehož je také odvozen jejich název, neboť koniferylalkohol (**9**) tvoří spolu se sinapylalkoholem a *p*-kumarylalkoholem základní stavební jednotky ligninu.



Obr. 4: Základní stavební jednotky flavonolignanů

V roce 1977 byla provedena syntéza silybinu kondenzací taxifolinu (6) s koniferylalkoholem (9) s použitím suspenzní kultury ze *Silybum marianum*.^[12] Byl také navržen možný mechanismus kondenzace obou stavebních jednotek katalyzovaný peroxidasou (Schéma 1, str. 14). Všechny látky ze skupiny silymarinu (kromě silydianinu, který jako jediný známý flavonolignan tvoří isostereoisomer) jsou diastereoisomery^[13] a u všech platí, že jejich chirální centra jsou ve vzájemném *trans* uspořádání. Jedná se o hydroxymethylovou skupinu a substituovanou fenylovou skupinu na dioxanovém (popř. tetrahydrofuranovém) kruhu. Silybin vzniká reakcí radikálů vzniklých z látek 6 a 9 působením peroxidasy (Schéma 1). Cyklizace adičního produktu těchto radikálů není stereoselektivní, jejím výsledkem je proto vždy směs dvou diastereoisomerů. Ostatní flavonolignany vznikají rovněž reakcí látek 6 a 9, ale odlišným mechanismem.

Kromě zmíněné biomimetické syntézy silybinu byla také publikována jeho totální syntéza,^[14] která však vedla ke směsi 4 stereoisomerů, z nichž pouze dva byly identické s přírodním silybinem (směsí silybinu A a B).

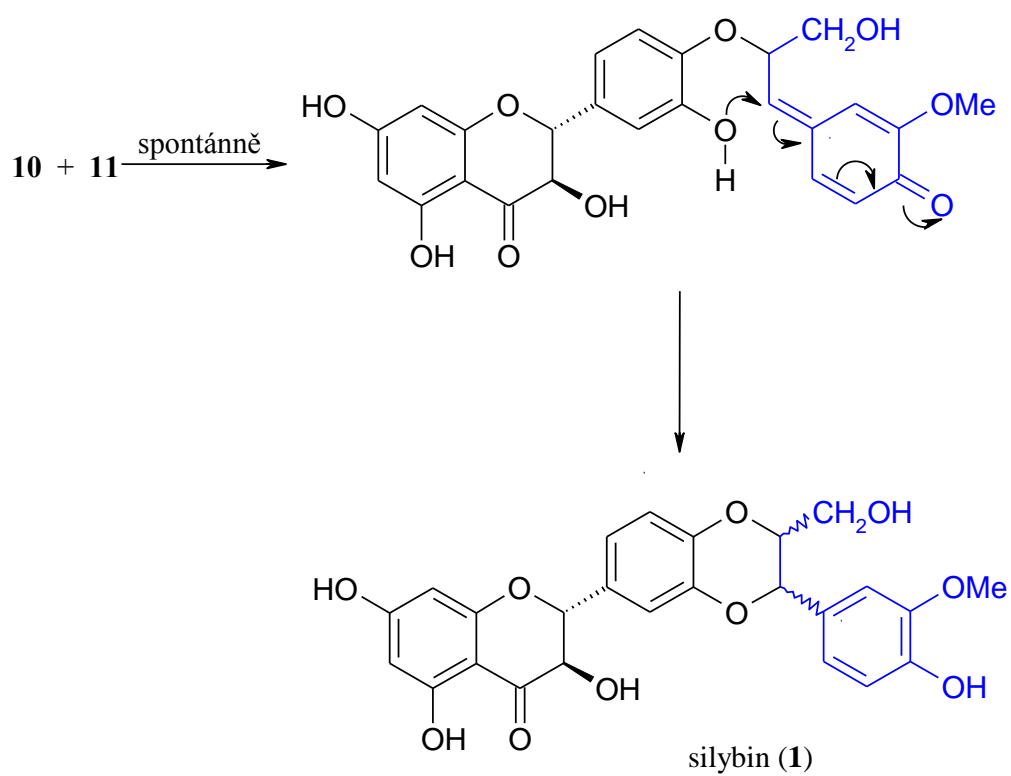
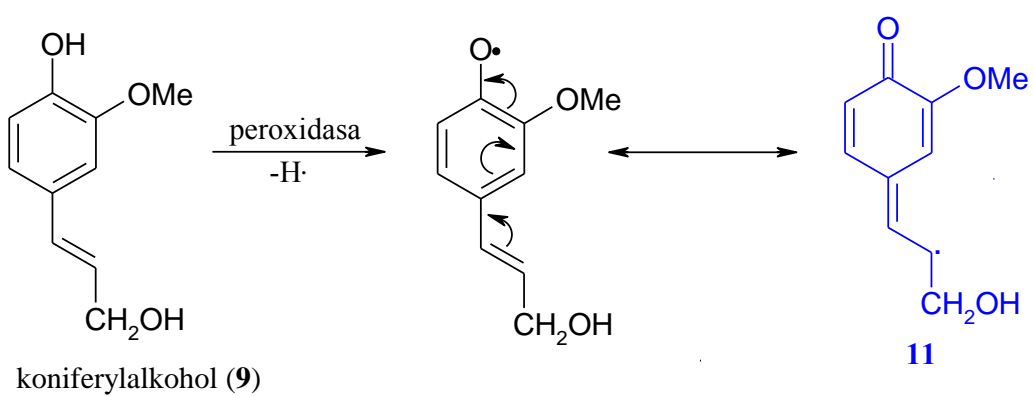
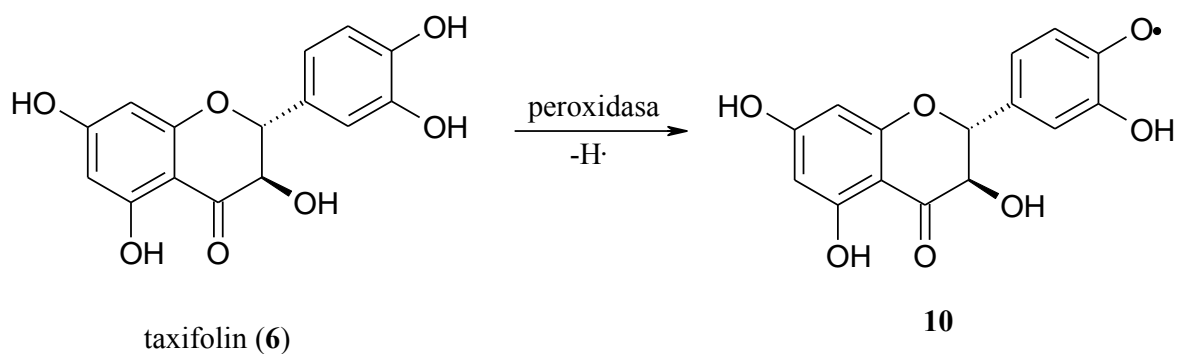


Schéma 1: Biosyntéza silybinu

Biosyntéza taxifolinu (**6**) je spojena s hlavními biosyntetickými drahami, které využívají prekursory šikimátové a acetát-malonátové dráhy (Schéma 2).^[15]

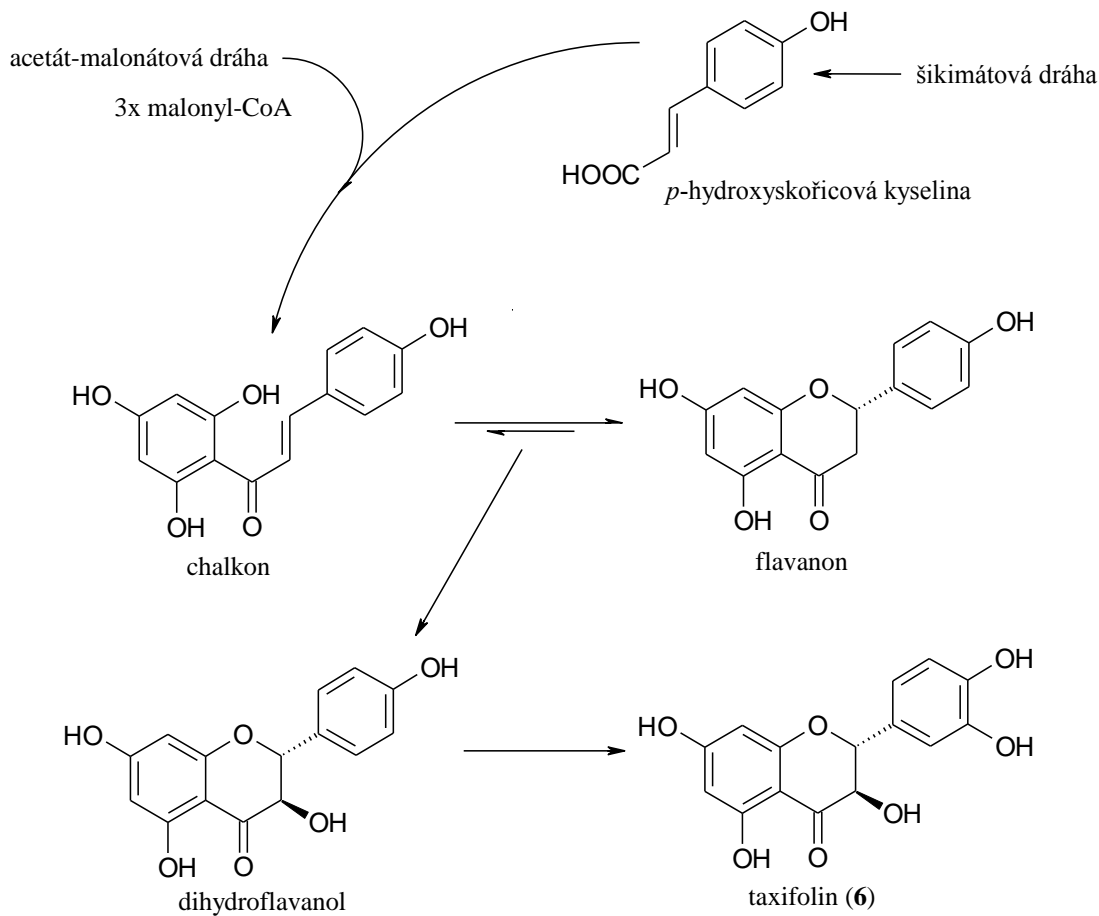


Schéma 2: Biosyntéza taxifolinu

Biosyntéza koniferylalkoholu (**9**) vychází z kyseliny šikimové (Schéma 3).^[16]

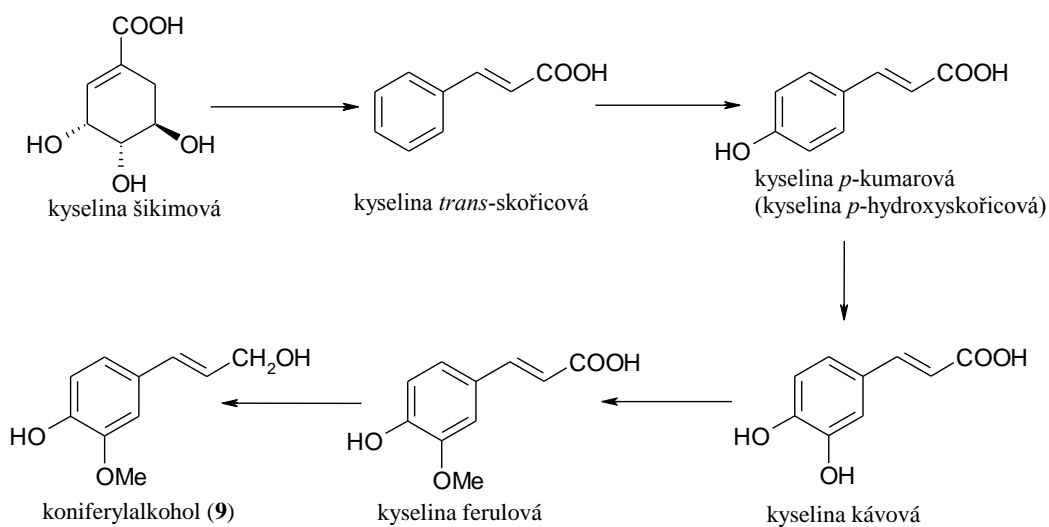


Schéma 3: Biosyntéza koniferylalkoholu

2.4 Semisyntetické deriváty silybinu

Nízká rozpustnost silybinu ve vodě (430 mg/l) značně limituje jeho biologickou dostupnost, a tím také terapeutickou účinnost. Proto byly připraveny hydrofilní deriváty silybinu jako jsou 3,23-*O*-bishemisukcinát silybinu (Legalon-SIL, Madaus),^[17] silybin-23-*O*-fosfát,^[18] 23-*O*-glykosidy silybinu (β -D-glukopyranosid, β -D-galaktopyranosid, β -laktosid a β -maltosid)^[19] a karboxylové kyseliny, získané selektivní oxidací silybinu a 2,3-dehydrosilybinu.^[20] 3,23-*O*-Bishemisukcinát silybinu je komerční léčivo, které se díky dobré rozpustnosti ve vodě používá intravenózně při léčbě akutních otrav mykotoxiny muchomůrek, protože působí na receptory, které zprostředkovávají vstup mykotoxinů do buněk. Ostatní hydrofilní deriváty silybinu nedosáhly komerčního využití. Přes svoji lepší rozpustnost ve vodě jsou jejich biologické účinky (především cytoprotektivní a antiradikálové) ve srovnání se silybinem podstatně nižší.

Kromě hydrofilních derivátů silybinu byla připravena celá řada jeho dalších derivátů, např. mono-, di- a tri-methyl- a benzyl-ethery silybinu, přičemž substituce byla prováděna převážně na fenolických hydroxylových skupinách silybinu.^[4,20,21,22] Vedle etherů silybinu byly připraveny také deriváty s regioselektivně navázanými esterovými skupinami (acetáty, benzoáty, butyráty, palmitáty a některé další estery silybinu), kdy acylace probíhala nejčastěji do poloh 7-OH a 23-OH.^[23,24,25]

Tyto deriváty byly využity zejména ke studiu biologických vlastností silybinu, případně k jejich modifikaci. Bylo například prokázáno, že některé alkyl-deriváty 2,3-dehydrosilybinu (připravené oxidací etherů silybinu) jsou poměrně účinnými inhibitory P-glykoproteinů.^[20] Estery silybinu s vyššími mastnými kyselinami, hlavně pak palmitáty, měly výrazně vyšší antivirovou aktivitu vůči chřipkovému viru H1N1, byly navíc účinnými inhibitory peroxidace lipidů a byla u nich zaznamenána zvýšená aktivita proti některým typům rakoviny. Série methyl-etherů silybinu byla navíc využita k objasnění mechanismu antiradikálové aktivity silybinu.^[22,26]

2.5 Biologické účinky silybinu (silymarinu)

Ostropestřec mariánský je používán již od starověku. Jako přírodní léčivo se používá na zažívací problémy gastrointestinálního traktu, nemoci žlučníku a jater, při

menstruačních obtížích a křečových žilách. Běžně se extrakt ze *S. marianum* používá při léčbě chronické virové hepatitidy^[27] a nemocí jater spojené s nadměrnou konzumací alkoholu či vystavení jaterním toxinům.^[28]

Vzhledem k majoritnímu zastoupení silybinu v silymarinu lze předpokládat, že za velkou část biologických účinků je zodpovědný právě silybin, což bylo také mnohokrát prokázáno výsledky biologických testů s čistým silybinem ve srovnání se silymarinem.^[1] *In vivo* chrání silybin játra proti různým jedům, např. proti allylalkoholu, hepatotoxinům muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*) - phalloidinu^[29,30] a α -amanitinu,^[31] dále pak tetrachlormethanu,^[32] galaktosaminu a thioacetamidu.^[33]

Silybin působí jako antioxidant,^[34] zvyšuje vylučování toxických látek z organismu^[35] a inhibuje tvorbu leukotrienů z polynenasycených mastných kyselin díky inhibici lipoxygenasy.^[36] Podporuje též proteosyntézu hepatocytu a ovlivňuje imunitní systém.^[37] Silybin má také pozitivní účinky na kůži a je vhodný pro její ochranu například při vystavení kůže UV záření a při řadě kožních poruch a poškození kůže jako jsou otoky, spálení pokožky slunečními paprsky, hyperplazie, poškození DNA, stárnutí kůže vlivem UV záření, melanogeneze a rakovina kůže.^[38,39]

Pro svou cytoprotektivní aktivitu je silybin využíván také jako chemoprotektivum, které inhibuje karcinogenní účinky mnoha chemikálií.^[40] Například prokazatelně snižuje výskyt nádoru močového měchýře a přednádorových lézí v iniciační nebo postiniciační fázi karcinogeneze experimentálně vyvolaných *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosaminem.^[41] Dále také snižuje karcinogenezi tlustého střeva u potkanů vyvolanou azoxymethanem.^[42] Prevence a léčba rakoviny prostaty je poměrně novou, přesto však velice důležitou aplikací silybinu, která je také dokumentována úspěšnými klinickými testy (klinická fáze II).^[43]

Za posledních pět let bylo publikováno více než 400 prací zabývajících se biologickými účinky silybinu, popř. silymarinu, přesto však bývá v literatuře často zaměňován silybin (čistá látka) za silymarin (komplex) a opačně.^[44] Silybin resp. silymarin je považován za bezpečné léčivo, neboť zatím nebyly zjištěny žádné vedlejší či negativní účinky na lidský organismus.^[45] Částečně je to dáno nízkou rozpustností flavonolignanů ve vodě, takže je téměř nemožné dosáhnout jejich toxické koncentrace *in vivo*.

2.6 Biologické účinky čistých diastereoisomerů silybinu

Je velmi dobře známým faktem, že biologické účinky stereoisomerů přírodních, ale také syntetických látek (enantiomerů, diastereoisomerů) jsou rozdílné a jejich určení je velmi důležité pro případnou aplikaci těchto chirálních látek v humánní medicíně (thalidomid). Vzhledem k absenci vhodné metody pro preparativní separaci diastereoisomerů silybinu však byly jeho biologické vlastnosti doposud studovány převážně za použití přírodního silybinu, tedy směsi silybinu A a B v poměru přibližně 1:1. Rozdílnost v chování obou diastereoisomerů silybinu v biologickém systému lze ve výjimečných případech pozorovat také při použití přírodního silybinu, jak dokládá farmakokinetická studie zveřejněná Weyhenmeyerem a kol.^[46] V této práci byla pomocí HPLC stanovována koncentrace konjugovaného (ve formě glukuronidu) a nekonjugovaného silybinu v plazmě, přičemž bylo zjištěno, že jeden z diastereoisomerů silybinu je glukuronidován třikrát rychleji než druhý. V té době však nebyla známa absolutní konfigurace obou diastereoisomerů, takže nebylo možno zjistit, který z isomerů silybinu je vlastně rychleji metabolizován. Na potvrzení této práce a určení totožnosti rychleji metabolizovaného isomeru silybinu (silybin B) se čekalo celých 8 let – tak dlouho trvalo, než se podařilo izolovat dostatečné množství čistých stereoisomerů silybinu na přípravu jejich glukuronidů, jež byly následně porovnány s autentickými lidskými metabolity silybinu.^[5]

Nezbytnost použití opticky čistých stereoisomerů silybinu a isosilybinu pro ověření jejich biologických aktivit velmi dobře ilustrují také následující příklady. Ve studii karcinomu lidské prostaty bylo prokázáno, že z testovaných látek - silybinu A a B, isosilybinu A a B a dalších složek silymarinu - je nejúčinnější v potlačení genu topoisomerasy II α v buňkách DU145 (androgen-independentní buněčná linie rakoviny prostaty) isosilybin B,^[3] a že silybin B je nejaktivnější v G1 fázi buněčného cyklu buněk DU145. Nedávno bylo zjištěno, že silybin B interaguje s estrogenním receptorem, zatímco silybin A je neaktivní.^[4] Z těchto studií je zřejmé, že vliv jednotlivých diastereoisomerů silybinu a isosilybinu na nejrůznější části biologického systému není shodný a pro další studium těchto efektů je nezbytné pracovat s čistými isomery obou látek.

2.7 Diastereoisomery silybinu a jejich separace

Silybin je směsí dvou diastereoisomerů, které lze jen velmi obtížně separovat. Není možné je oddělit klasickými separačními metodami jako je chromatografie na silikagelu či krystalizace. Směs silybinu A a B krystalizuje ve formě směsných mikrokystalů, obsahujících ekvimolární poměr obou diastereoisomerů.

Chemické modifikace silybinu byly dosud prováděny výlučně s přírodním (směsným) silybinem, protože opticky čisté diastereoisomery silybinu A a B bylo možno dosavadními metodami získat pouze v malém množství (desítky mg).

Tyto stereoisomery silybinu byly dosud získávány téměř výlučně pomocí semipreparativní HPLC. Někteří autoři sice tvrdí, že dosáhli preparativní separace (pomocí HPLC), nicméně množství jednotlivých čistých silybinů nepřesahuje ani v tomto případě více než 10 - 20 mg opticky čisté látky.^[47] Nedávno publikovaná studie,^[48] která je zaměřena na preparativní separaci silybinů A a B a dalších látek obsažených v silymarinu, také využívá metodu HPLC. Při bližším pohledu je však zřejmé, že je tato práce založena na optimalizaci dříve publikovaných HPLC metod ve větším měřítku a jejich zdlouhavém opakování (přes 150 nástřiků) a sami autoři přiznávají, že "... je možné generovat gramová množství každého diastereoisomeru během několika měsíců. ...".^[48]

Ačkoliv diastereoisomery silybinu není možno separovat pomocí preparativní sloupcové chromatografie na silikagelu (nemodifikovaném), byla vyvinuta metoda, která tuto nevýhodu obchází. Spočívá v chemické modifikaci přírodní směsi obou isomerů silybinu. Glykosylace této směsi na 23-*O*- β -D-2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylgalaktopyranosyl-silybin (**8**) (jež je opět tvořen směsí dvou diastereoisomerů – **8a** a **8b**) již umožňuje jejich preparativní separaci pomocí běžné preparativní chromatografie na silikagelu. Separace však není vzhledem k velice blízké polaritě obou látek dokonalá a pro získání jednotlivých isomerů silybinu v dostatečné optické čistotě je nutné ji několikrát opakovat, což je spojeno se ztrátami. Získané opticky čisté glykosidy silybinu je následně nutné převést na jejich aglykony, což je podle publikované metody realizováno dvoukrokově - deacetylací cukerné části glykosidu a následnou aplikací glykosidasy, která odštěpí cukernou složku molekuly a uvolní tak opticky čistý silybin A, respektive B (*schéma 4, str. 20*).^[49] Popsaná metoda je poměrně pracná a navíc je limitována množstvím vstupního silybinu, slouží tedy spíše k získání stovek mg obou látek, což ovšem nepostačuje k rozsáhlejším biologickým studiím ani k chemickým modifikacím.

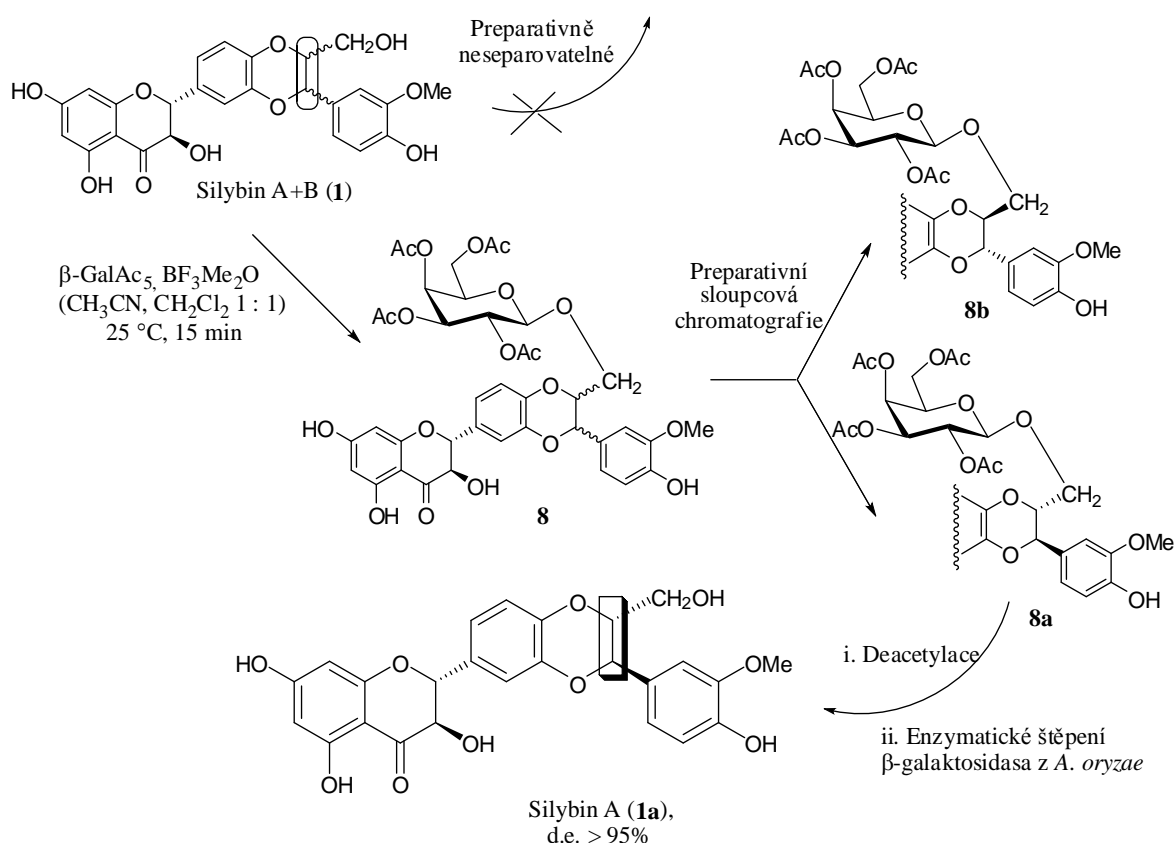


Schéma 4: Separace silybinu A a B pomocí jejich galaktosidů

Slibnou možností, která by mohla poskytnout významnější množství čistých diastereoisomerů silybinu, je využití enzymů schopných selektivního štěpení vhodně modifikovaného silybinu (směsi tvořené stejným derivátem silybinu A a B), popř. přímo chirálně separovat jeden z diastereoisomerů silybinu při jeho enzymové modifikaci na příslušný derivát.

Pro výběr z širokého spektra enzymů vhodných k chirální separaci diastereoisomerů silybinu je nutno vycházet z několika předpokladů:

a) dostupnost vhodného enzymu (komerční, stabilizovaný a v neposlední řadě finančně dostupný),

b) dostupnost příslušného substrátu pro enzymovou reakci, tj. je-li použit semisyntetický derivát diastereoisomerní směsi obou silybinů, měl by být snadno připravitelný (nejlépe jednokrokovou reakcí) ve vysokém výtěžku.

Obě podmínky jsou splněny pro estery, popř. glykosidy silybinu jako substráty hydrolas.

2.8 Hydrolasy

Hydrolasy (EC 3.1.1) patří do třídy enzymů, které katalyzují hydrolytické štěpení vazeb, které vznikly nebo mohly vzniknout kondenzací molekul za odštěpení vody. Jedná se o nejpočetnější třídu enzymů, která plní řadu biochemicky nezastupitelných funkcí (jako je trávení, hemokoagulace pomocí thrombinu, regulace aktivity enzymů pomocí fosfatas, posunování rovnováhy reakcí štěpením difosfátu, realizace endergonických procesů zajišťovaná ATPasami, membránová fosforylace atd.).^[50] Do této skupiny enzymů patří například peptidasy a proteasy (proteinasy), které štěpí peptidové vazby, glykosidasy (např. amylasy), které hydrolyzují vazby glykosidové a také esterasy (např. lipasy, fosfolipasy a fosfatasy) štěpící vazby esterové v přítomnosti organických rozpouštědel. Hydrolasy jsou však využívány také k syntéze výše zmiňovaných vazeb, v tomto případě je však nutno pracovat v bezvodém prostředí, případně vodu vzniklou při reakci vhodným způsobem vázat.^[51]

2.8.1 Glykosidasy

Glykosidasy zařazené do podtřídy EC 3.2.1 jsou enzymy katalyzující hydrolýzu *O*- nebo *S*-glykosidických vazeb.^[52] Jsou to enzymy, které hrají důležitou roli v přírodě - účastní se rozkladu biomasy, jako je celulóza a hemicelulóza, anti-bakteriální obranné strategie (např. lysozym), patogenetických mechanismů (např. virové neuraminidasy) a normálních buněčných funkcí. Mohou být klasifikovány jako *exo*- a *endo*-glykosidasy, v závislosti na tom, zda hydrolyzují vazby od konce nebo ve středu oligo/polysacharidového řetězce. Podle mechanismu reakce můžeme glykosidasy rozdělit na invertující (mění stereochemii) a na glykosidasy zachovávající stereochemii na opticky aktivním uhlíku (retenující).

2.8.1.1 Chirální separace enantiomerů pomocí glykosidas

Glykosidasy lze využít pro separace enantiomerů (resp. diastereoisomerů) dvěma způsoby. Prvním je hydrolýza chemicky připravené stereoisomerní směsi glykosidů, kdy enzym hydrolyzuje pouze jeden z isomerů za vzniku opticky čistého aglykonu a druhý zůstává ve formě opticky čistého glykosidu. Druhý způsob je použití glykosidas jako selektivní glykosyltransferasy. Toto vychází z obecných vlastností enzymu rozlišovat rozdíly v konfiguraci substrátů ve formě aglykonu.^[53,54,55,56] Regio- a stereoselektivitou

glykosidas se zabývali Crout a kol.,^[57] kteří používali β -galaktosidasu z *Escherichia coli*, a Trincone a kol.,^[58] kteří zkoumali aktivitu β -galaktosidasy ze *Sulfobolus solfataricus*. Pro velké množství alkoholů a diolů s krátkým řetězcem byla nalezena galaktosyltransferasa, která po reakci s nimi poskytovala diastereoisomerně obohacené směsi. Huber a kol.^[59] objasnili stereoselektivitu pro jednotlivé aglykony v závislosti na jejich konfiguraci pomocí modelu aktivních řetězců bakterie *E. coli*.

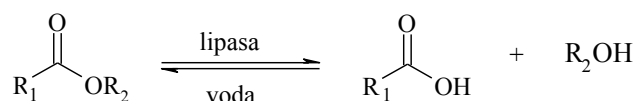
2.8.2 Lipasy

Podle původní definice jsou lipasy (EC 3.1.1.3) enzymy, které jsou schopny hydrolyzovat jednu či více esterových vazeb triacylglycerolů.^[60] Lipasy jsou však schopny hydrolyzovat rovněž jiné typy substrátů. Rozdíl mezi lipasami a dalšími členy rodiny karboxyl-ester hydrolas (EC 3.1.1) není vždy zcela zřejmý. Lipasy mohou být místo toho charakterizovány dramatickým zvýšením své aktivity, jestliže působí na substrát (ve formě micel, popř. emulgovaný) na mezifázovém rozhraní lipidů a vody.^[61] Tato změna v enzymové aktivitě je nazývána mezifázovou aktivací.

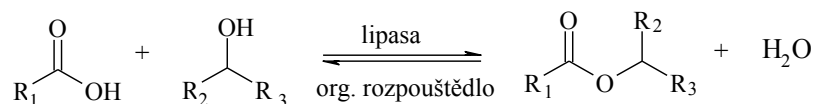
Pro svoji regio- a stereo-specifitu jsou nejčastěji používanými enzymy nejen při laboratorních, ale také při průmyslových biotransformacích. Aplikace lipas k separaci enantiomerních popř. diastereoisomerních směsí má díky své jednoduchosti a nesrovnatelně lepší selektivitě oproti chemické syntéze stále vzrůstající trend.^[51]

Vzhledem k tomu, že lipasy patří do třídy serin hydrolas, nepotřebují při svých reakcích kofaktory. Výhodou lipas je jejich snadná dostupnost, používají se jak ve volné tak v imobilizované formě, jsou relativně levné, ekologicky nezávadné, plně biologicky odbouratelné, vysoce stabilní a mohou přeměňovat široké spektrum substrátů, a přitom si zachovávají vysokou stereoselektivitu.^[62] Lipasy mají afinitu k hydrofobnímu prostředí (pracují na hydrofobně-hydrofilním rozhraní), čímž se liší od ostatních hydrolytických enzymů. Díky této vlastnosti umožňují pracovat nejen ve vodných roztocích, ale také v organických rozpouštědlech, což přináší řadu výhod jako je rozšíření spektra modifikovaných látek (řada organických sloučenin je ve vodě prakticky nerozpustná), snadné zpracování reakční směsi a použití mírných reakčních podmínek (laboratorní teplota, neutrální pH).^[62] Příklady reakcí katalyzovaných lipasami jsou znázorněny na obr. 5 (str.23).

1. Hydrolýza (vodné prostředí)

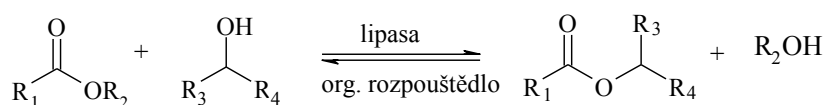


2. Esterifikace (organické prostředí)

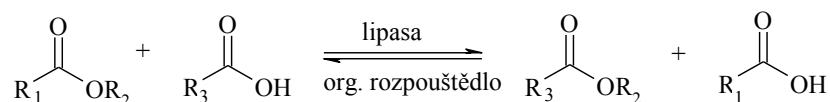


3. Transesterifikace

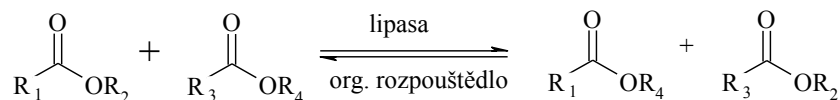
a) Alkoholýza



b) Acidolýza



4. Interesterifikace

**Obr. 5: Příklady reakcí katalyzovaných lipasami**

Na stereoselektivitu lipas má vliv široké spektrum faktorů jako je diferenciací enantiotopů (enzym může rozlišovat mezi různými stereoisomerními centry prochirální molekuly), diferenciací enantiomerů (vlastní enantioselektivita je dána kompetitivní reakcí chirálního acyl-donoru a akceptoru s enzymem), typ substrátu, biochemická interakce substrátu s enzymem, sterická interakce substrátu, substrátová kompetice, povaha a dostupnost aktivního místa pro stereoselektivní působení, přítomnost vody a povaha přítomných rozpouštědel (hlavně jejich polarita).^[51]

2.8.2.1 Kinetika reakcí katalyzovaných lipasami

Kinetické rozlišení racemických směsí katalyzované lipasami je jedním z nejčastějších přístupů k získání enantiomerně čistých, popř. obohacených látek. Toto kinetické rozlišení je definováno jako „Dosažení částečného nebo úplného rozlišení na základě nestejných rychlostí reakce enantiomerů racemické směsi s chirálním agens (činidlo, katalyzátor, rozpouštědlo, atd.).“^[63] Tato metoda má svá omezení, v ideálním případě je reakce zastavena při dosažení 50 %-ní konverze, kdy je jeden z enantiomerů (ten, který interaguje s enzymem rychleji) přeměněn na produkt, zatímco druhý enantiomer ještě nezačal vstupovat do reakce s enzymem. Tímto postupem je tedy možno dosáhnout maximálně 50%-ního výtěžku enantiomerně čistého produktu. Ve skutečnosti bývá výtěžek opticky čistého produktu většinou nižší, neboť rozdíl v rychlosti reakce obou enantiomerů (vyjadřovaný také jako enantioselektivita enzymu) bývá obvykle méně výrazný a reakci je pak nutno ukončit ještě před dosažením 50 %-ní konverze.^[62]

Pro kvantitativní popis stereoselektivity enzymových reakcí je potřeba definovat několik důležitých parametrů, které se zde často používají.

Enantiomerní přebytek (označovaný také jako enantiomerní výtěžek) je označován zkratkou e.e. popř. ee. Pro směs (+)- a (-)-enantiomerů, jejíž složení je dáno molární frakcí $F_{(+)}$ a $F_{(-)}$, pro níž platí, že $F_{(+)} + F_{(-)} = 1$, je enantiomerní přebytek definován jako $|F_{(+)} - F_{(-)}|$, popř. procentuální enantiomerní přebytek jako $100|F_{(+)} - F_{(-)}|$.

Jestliže známe obsah obou složek enantiomerní směsi, můžeme ee vypočítat podle následujícího vzorce:

$$ee (\%) = ((R-S)/(R+S)) \times 100$$

kde R, S je obsah jednotlivých enantiomerů dané směsi, přičemž platí, že $R + S = 1$ (popř. $R + S = 100$, jestliže jsou obsahy R a S vyjádřeny v procentech).

Hodnota E udává enantioselektivitu rozlišení a je vypočítána na základě enantiomerní čistoty substrátu nebo produktu a/nebo konverze:

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1+ee_s)]}{\ln[(1-c)(1-ee_s)]} = \frac{\ln[(1-c)(1+ee_p)]}{\ln[(1-c)(1-ee_p)]} = \frac{\ln \frac{[ee_p(1-ee_s)]}{[ee_p + ee_s]}}{\ln \frac{[ee_p(1+ee_s)]}{[ee_p + ee_s]}}$$

kde E – enantioselektivita, c – konverze (0-1), S – substrát, P – produkt.

Pokud je enantioselektivita (E):

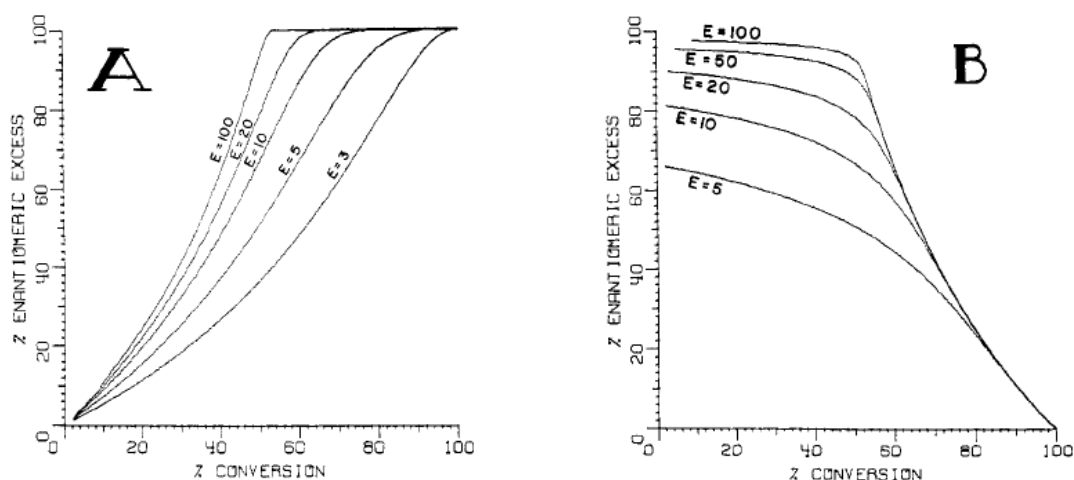
$E < 10$ – selektivita je neuspokojivá (opticky čistý je získán pouze substrát, výtěžek reakce je výrazně nižší než 50 %)

$E > 20$ – selektivita je průměrná, ale akceptovatelná pro získání obou enantiomerů

$E = 100$ – selektivita je velice dobrá

$E \geq 100$ – selektivita je excelentní, ale exaktně neměřitelná (náchylná k chybám)

Praktický dopad enantioselektivity na konverzi substrátu nebo výtěžek produktu je znázorněn na *obrázku 6*.



Obr 6: Závislost enantiomerního přebytku (e.e.) na enantioselektivitě (E) pro: A) konverzi substrátu, B) výtěžek produktu. (převzato z:[64])

Zcela analogické vztahy jako jsou využívány pro enantioselektivitu (E) a enantiomerní přebytek (e.e.), lze použít také pro vyjádření selektivity enzymu vůči směsi diastereoisomerů (diastereoselektivita) a pro optickou čistotu stereoisomeru, tj. diastereoisomerní přebytek (d.e.).

2.8.2.2 Alkoholy jako substráty lipas

Alkoholy patří mezi nejuniverzálnější substráty lipas. Nejvhodnějším substrátem jsou sekundární alkoholy, pro něž vykazují lipasy v porovnání s primárními a terciárními alkoholy největší enantioselektivitu.^[65] U chirálních primárních alkoholů lze zlepšení enantioselektivity dosáhnout snížením reakční teploty,^[66,67] volbou délky řetězce kyseliny tvořící ester s primárním alkoholem (s rostoucí délkou řetězce kyseliny se zlepšuje enantioselektivita hydrolýzy esterů) a volbou rozpouštědla.^[68] Použití terciárních alkoholů je nejméně běžné, přesto se jich využívá k přímé syntéze některých antibiotik, jako např. cyklopentanoidu nebo kjellmanianonu.^[69]

2.8.2.3 Mechanismus působení lipas

Jednotlivé lipasy se liší počtem aminokyselin v primární struktuře, např. lipasa z *Candida rugosa* obsahuje více než 500 aminokyselin, lipasa B z *Candida antarctica* (CAL-B) má 317 aminokyselin. Obecně platí, že aktivní místo všech lipas se skládá ze tří aminokyselin, tzv. katalytické triády, tvořené serinem, aspartátem (popř. glutamátem) a histidinem. 3D struktura charakteristická pro všechny lipasy se skládá z centrálního β -listu, obklopeného po obou stranách variabilním počtem α -helixů.^[62]

Aktivní centrum je tvořeno z katalytické triády, aminokyselinových zbytků stabilizujících intermediární tetraedrický anion vzniklý ze substrátu a většinou také z tzv. „víčka“ (angl. lid), což je α -helikální segment, který blokuje vstup do aktivního místa a je tak zodpovědný za zmiňovanou mezifázovou aktivaci lipas. Na základě rentgenostrukturní analýzy krystalů lipas před a po vazbě substrátu bylo zjištěno, že před vlastní transformací substrátu nejdříve dochází k aktivaci enzymu.^[70] K reakci lipas dochází na mezifázovém rozhraní voda-olej. Volně rozpuštěná lipasa v nepřítomnosti tohoto rozhraní zůstává v inaktivním stavu a část molekuly enzymu zakrývá aktivní místo. Jakmile dojde ke kontaktu enzymu s rozhraním dvoufázového systému voda-olej, krátký α -helix se ohne, což vede k aktivaci lipasy. Jinými slovy, v nepřítomnosti substrátu je „víčko“ uzavřeno a enzym je inaktivní, v přítomnosti substrátu existuje rozhraní voda-olej, α -helikální segment uvolní vstup do aktivního místa a lipasa je aktivní.^[62]

Mezi výjimky patří CAL-B, u níž toto „víčko“ zcela chybí, takže nedochází k regulaci aktivity lipasy. Další zvláštností tohoto enzymu je také jiná aminokyselinová sekvence, kde místo GX SXG je první aminokyselina (glycin) nahrazena threoninem.^[71]

Na *schématu 5* je znázorněn mechanismus účinku katalytické triády Ser, His, Asp při hydrolýze esteru. Uspořádání těchto tří aminokyselin způsobuje pokles hodnoty pK_a hydroxylové skupiny serinu (zvýšení její kyselosti), což umožní nukleofilní atak na karboxylovou skupinu substrátu R_2COOR_1 (krok 1). Acyl substrátu je tak kovalentně vázán na enzym, tvoří se meziprodukt acyl-enzym a odpadáva alkohol R_1OH . Ve druhém kroku nukleofil (například voda) atakuje intermediát acyl-enzym, dochází k regeneraci enzymu a k uvolnění karboxylové kyseliny R_2COOH (krok 2). V závislosti na použitém rozpouštědle (vodném nebo organickém) může jakýkoliv jiný nukleofil soutěžit s vodou o intermediát acyl-enzym, čehož lze využít k celé řadě synteticky užitečných transformací, např. syntéze esterů, amidů, peroxokyselin, hydrazidů a hydroxamových kyselin.

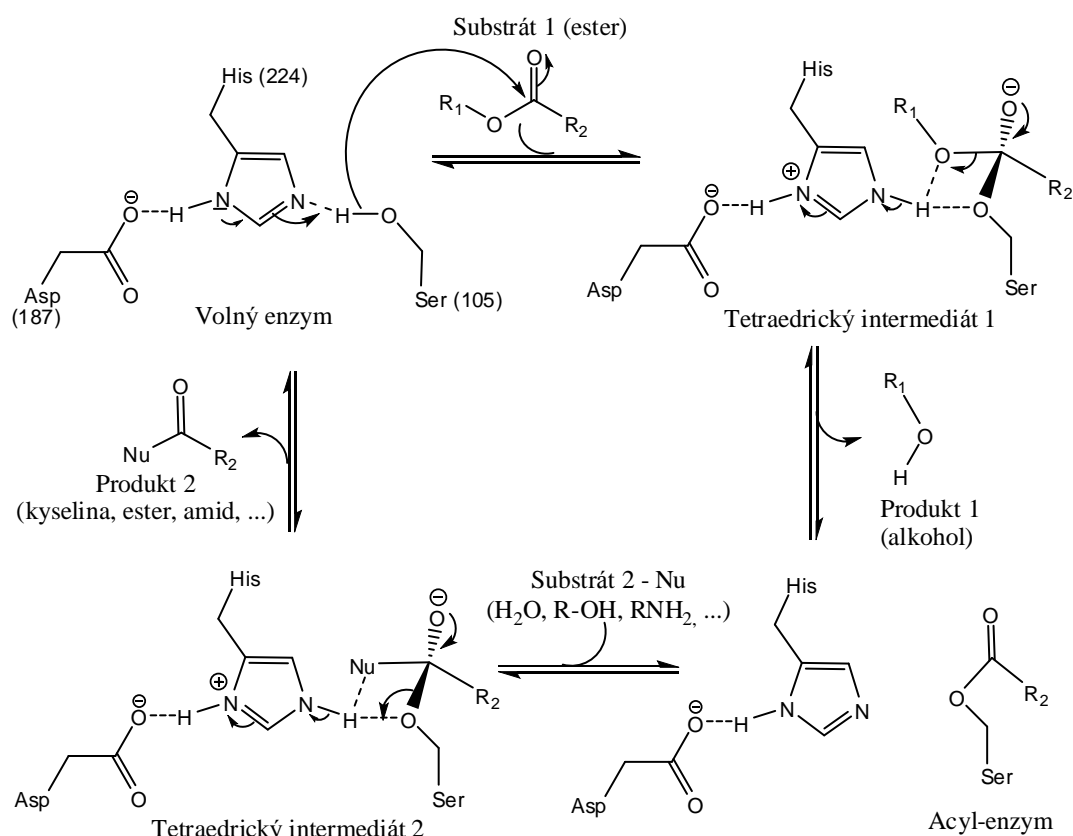


Schéma 5: Funkce katalytické triády Ser, His, Asp v mechanismu působení lipas

2.8.2.4 Chemické modifikace lipas

Modulace konformačních změn lipas během katalýzy (např. imobilizací nebo chemickou modifikací) dovolila pozměnit katalytické vlastnosti mnoha různých lipas (např. enantiospecifitu nebo regiosektivitu) a v některých případech vedla také k jejich aktivaci, případně stabilizaci.^[72,73,74,75,76] Z velkého množství lipas se jako nejcitlivější k těmto strategiím ukázala lipasa B z *Candida antarctica* (CAL-B), přestože i modifikace dalších lipas vedly ke zlepšení jejich katalytických vlastností. Lipasa z *Candida rugosa* modifikovaná benzyloxykarbonylovou skupinou vykazovala v případě hydrolýzy racemického butyl 2-(4-ethylfenoxy)-propionátu 15-ti násobné zvýšení enantiosektivity ve srovnání s nativní lipasou.^[77]

Velmi zajímavou aplikací chemických modifikací lipas je použití těchto metod na již modifikovaném (imobilizovaném) enzymu. To usnadňuje většinu následných operací, hlavně pak zpracování reakce a purifikaci výsledného preparátu. Nejlépe zdokumentovaným příkladem takovéto varianty jsou chemické modifikace Novozymu 435.^[78]

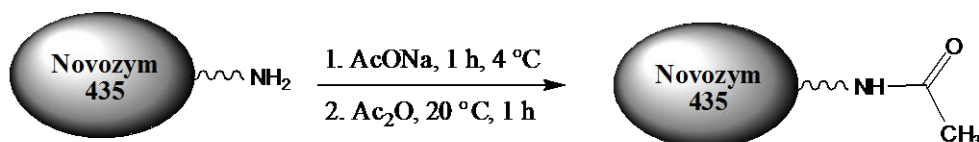
Novozym 435 je lipasa B mikroorganismu *Candida antarctica* imobilizovaná na makroporézní polyakrylamidové pryskyřici. CAL-B má 317 aminokyselin a molekulovou hmotnost 33 kDA, je to vysoce stereoselektivní enzym, zvláště když je substrátem sekundární alkohol. Aktivní centrum je tvořeno katalytickou triádou Ser 105, His 224 a Asp 187 a oxanion stabilizujících zbytků. 3D struktura je stejně jako u ostatních lipas složena z centrálního β -listu, obklopeného po obou stranách α -helixy, serinová triáda je v rozpouštědle zpřístupněna pomocí úzkého a hlubokého kanálu.

Chemické modifikace Novozymu 435 jsou založeny na reakci karboxylových skupin na povrchu enzymu (po jejich aktivaci karbodiimidem) s ethylendiaminem nebo ethanolaminem za použití známých procedur^[75,79] nebo modifikací povrchových amino-skupin anhydridem kyseliny jantarové (obr. 7, str. 29).^[80]

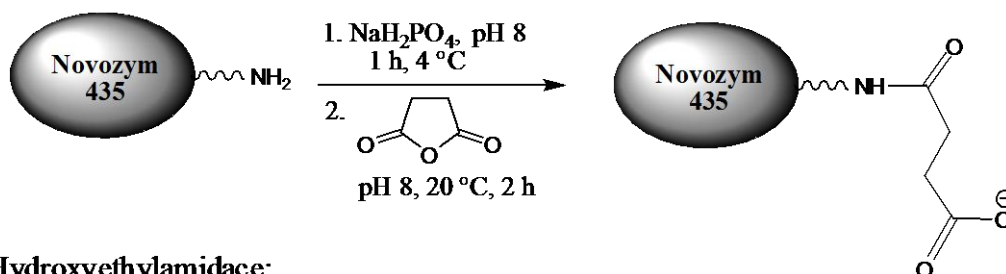
Tyto modifikace byly aplikovány na Novozym 435 s rozdílnými výsledky. Sukcinylace Novozymu 435 vedla podle očekávání k výraznému snížení jeho aktivity, enantiosektivita biokatalyzátoru při hydrolýze racemického methyl-esteru kyseliny mandlové se však zvýšila z $E = 1$ (ee = 0 %) na 13 (ee = 83 %).^[78] Při hydrolýze 2-*O*-butyryl-2-fenylctové kyseliny byla enantiosektivita Novozymu 435 zachována, případně snížena nebo dokonce invertována v závislosti na použité chemické modifikaci. Chemická

modifikace Novozymu 435 však nemusí být vždy spojena se snížením jeho enzymové aktivity, jak dokládá případ hydrolýzy racemického dimethylesteru kyseliny 3-fenylglutarové. Sukcinylace enzymu zde vedla k trojnásobnému zvýšení enzymové aktivity v porovnání s nemodifikovaným Novozymem 435.^[78]

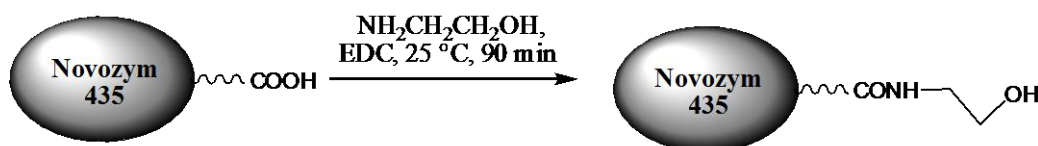
Acetylace:



Sukcinylace:



Hydroxyethylamidace:



Obr. 7: Schematické znázornění chemických modifikací lipasy B z *C. antarctica* (Novozym 435)

Uvedené výsledky ukazují, že chemické modifikace, měnící charakter iontových interakcí převážně na povrchu enzymu, mají významný vliv na jeho katalytické vlastnosti.^[75] Z uvedených výsledků však vyplývá, že efekt modifikace lze jen obtížně předem odhadnout, jak bylo popsáno v řadě případů.^[72,73] Přesto je tato možnost modulace enzymové aktivity již existujícího enzymu poměrně lákavou možností, která může pomoci v řešení separace mnoha doposud neseparovatelných racemických směsí chirálních látek.

2.8.2.5 Stereoselektivita lipas

Pro úspěšné zvládnutí separace diastereoisomerů silybinu v preparativním měřítku měla zásadní význam mezinárodní spolupráce naší laboratoře s ústavem Chemie molekulárního rozpoznávání (C.N.R., Milano), kde bylo provedeno základní testování 26 komerčních hydrolas (lipas, proteas a acylas) na jejich schopnost chirálně rozlišit oba

isomery silybinu při jejich transesterifikaci na 23-*O*-acetyl-silybin (**12**). Současně s transesterifikační reakcí byla sledována také diastereoselektivita hydrolýzy **12** na volné silybiny. Přehled výsledků tohoto testování včetně použitých podmínek je shrnut v *tabulkách* (tab. 1 a tab. 2, str. 31). Jak je zřejmé z této tabulky, transesterifikační reakce poskytující acetát **12** nevykazuje dostatečnou diastereoselektivitu (charakterizovanou parametrem *E*) pro další využití této reakce k chirální separaci diastereoisomerů silybinu. Výsledky hydrolytické reakce jsou nesrovnatelně lepší, a to jak po stránce diastereoselektivity, tak také konverze této reakce. Z tohoto testování postoupili do další fáze pokusů pouze dvě lipasy: lipasa z *C. rugosa* a Novozym 435 (imobilizovaná lipasa B z *C. antarctica*), které vykazovaly opačnou diastereoselektivitu hydrolýzy (a také transesterifikace), a pro něž byly reakční podmínky dále optimalizovány s cílem zlepšit dva základní parametry – konverzi a hlavně diastereoselektivitu.

V rámci této optimalizace byl nejprve ověřen vliv délky řetězce použité kyseliny, tvořící ester se silybinem, kdy byl porovnáván průběh hydrolýzy 23-*O*-butanoyl-silybinu (**13**) a 23-*O*-oktanoyl-silybinu (**14**) ve srovnání s acetátem **12**. Oba enzymy vykazovaly podobné chování, v porovnání s acetátem **12** byla reakce s butanoátem **13** rychlejší, ale o něco méně selektivní. Oktanoát **14** se ukázal jako nejhorší substrát s velmi nízkou selektivitou. Na základě těchto experimentů byla další práce prováděna s acetátem **12**.

Tab. 1: Transesterifikace silybinu pomocí různých lipas

Enzym	Čas [h]	Konverze [%]	<i>E</i> ^[a]
lipasa PS	48	39,7	1,6 (B)
lipasa CV	48	14,4	2,4 (A)
lipasa A	48	8,4	5,5 (B)
lipasa z <i>C. rugosa</i>	3	16,8	4,4 (A)
Novozym 435	3	32,9	2,6 (B)
lipasa CAL-A	48	33,0	2,0 (A)
lipasa z <i>Alcaligenes</i> sp.	18	47,9	1,0 (-)
subtilisin	48	37,2	1,7 (B)
acylasa Amano 3000	48	2,9	1,7 (B)

Reakční podmínky transesterifikace: silybin (**1**, 5 mg, 10,4 μmol) byl rozpuštěn ve směsi MTBE/vinylacetát (10:1; 1,1 ml). Ke vzniklému roztoku byl přidán odpovídající enzym (50 mg, resp. 5 mg Novozymu 435) a reakční směs byla protřepávána při 45 °C.

Reakce byly analyzovány pomocí HPLC při konverzích < 50 % v daném čase.

^[a] Zvýrazněné hodnoty označují nejlepší selektivitu a v závorce je vyznačen preferovaný diastereoisomer.

Tab. 2: Hydrolýza 23-O-acetyl-silybinu pomocí lipas

Enzym	Čas [h]	Konverze [%]	<i>E</i> ^[a]
lipasa A	48	5,3	1,8 (B)
lipasa z <i>C. rugosa</i>	5	29,0	21,1 (A)
Novozym 435	3	33,7	6,5 (B)
lipasa z <i>Alcaligenes</i> sp.	48	3,4	1,5 (B)
subtilisin	48	2,6	1,1 (B)
proteasa N	48	4,0	1,1 (B)
proteasa P	48	14,8	1,1 (B)
kyselá proteasa II	48	4,3	1,2 (B)
acylasa Amano 3000	48	8,3	1,4 (B)

Reakční podmínky hydrolýzy: 23-O-acetyl-silybin (**12**, 5 mg, 9,7 μmol) byl rozpuštěn ve směsi MTBE/n-butanol (10:1; 1,1 ml). Následně byl přidán odpovídající enzym (50 mg, resp. 5 mg Novozymu 435) a reakční směs byla protřepávána při 45 °C.

Reakce byly analyzovány pomocí HPLC při konverzích < 50 % v daném čase.

^[a] Zvýrazněné hodnoty označují nejlepší selektivitu a v závorce je vyznačen preferovaný diastereoisomer.

V dalších experimentech byl zkoumán vliv rozpouštědel na diastereoselektivitu reakcí katalyzovaných Novozymem 435 a lipasy z *C. rugosa*, testovaná rozpouštědla jsou uvedena v *tabulce 3*. Hydrolytická reakce probíhala za použití Novozymu 435 v přítomnosti všech testovaných rozpouštědel, s výjimkou acetonitrilu a acetonu (*tab. 3, str. 32*). Nejlepší výsledky (konverze a *E*) byly získány v toluenu, MTBE a *terc*-amyl alkoholu. V případě lipasy z *C. rugosa* byla nalezena pouze dvě vhodná rozpouštědla, toluen (27 %-ní konverze po 4 h, *E* = 40) a MTBE (29 %-ní konverze po 5 h, *E* = 21).^[81]

Tab. 3: Vliv rozpouštědel na diastereoselektivitu reakcí

Rozpouštědlo	Čas (h)	Konverze (%)	<i>E</i>
toluen	5	40	7,7
TBME	3	34	6,5
THF	5	13	1,9
dioxan	5	6	3,6
<i>tert</i> -amyl alkohol	4	46	7,0
acetonitril	24	0	0
aceton	24	0	0

Reakční podmínky: silybin (1, 5 mg, 10.4 μ mol) byl rozpuštěn ve směsi testovaného rozpouštědla a n-butanolu (10:1; 1,1 ml). K vzniklému roztoku byl přidán Novozym 435 (5 mg) a reakční směs byla protřepávána při 45 °C.

0 - reakce neprobíhá

Přestože lipasa z *C. rugosa* vykazovala výrazně vyšší diastereoselektivitu než Novozym 435, v průběhu dalších testů se ukázalo, že zmíněnou aktivitu měla pouze jediná, poměrně stará „šarže“ tohoto enzymu. Z dalších pokusů vyplynulo, že za zmíněnou selektivitu této lipasy je pravděpodobně zodpovědná určitá minoritní nečistota s hydrolytickou aktivitou, nicméně tuto hydrolasu se nepodařilo identifikovat. Pokusy s purifikovanou lipasou z *C. rugosa* byly neúspěšné, tato lipasa se ukázala jako zcela neefektivní pro chirální separace silybinu.

2.8.3 Regioselektivita lipas a její využití pro přípravu esterů flavonoidů

Lipasy lze využít nejen k chirálním separacím racemických či diastereoisomerních směsí, ale také k syntéze užitečných meziproductů pro chemické syntézy, případně derivátů, které mají sami o sobě významně lepší biologickou aktivitu než původní látka. Je to umožněno tím, že tyto enzymy nerozlišují pouze chiralitu substrátu, ale v případě, kdy substrát nese více reaktivních skupin pro jejich působení (multifunkční substrát), jsou schopny určitá centra preferovat a selektivně esterifikovat, popř. hydrolyzovat pouze některá z nich. Tato schopnost je nazývána regioselektivitou.

Význam regioselektivně acylovaných derivátů silybinu byl již poměrně dobře prokázán, některé deriváty silybinu mají v mnoha směrech významně lepší biologickou aktivitu než samotný silybin.^[23,24,25] Jejich chemická syntéza je však poměrně problematická (omezená regioselektivita, nízké výtěžky požadovaných esterů) a mnohé polohy silybinu je možno selektivně esterifikovat teprve s využitím komplikovaných chránících strategií, což zvyšuje náročnost syntézy, a též snižuje výtěžek finálního esteru. Nalezení lipasy, jež by byla schopna selektivně esterifikovat tyto „problematické“ skupiny silybinu, popř. hydrolýzou peracylovaného derivátu silybinu poskytnout jinak obtížně dostupný ester, by výrazně přispělo ke studiu těchto významných derivátů silybinu.

Regioselektivitu lipas lze ovlivnit celou řadou faktorů, které jsou často velice podobné jako při ovlivnění jejich stereoselektivity: volbou použitého rozpouštědla, strukturou použitého substrátu (ester s kyselinou s krátkým nebo dlouhým uhlíkatým řetězcem; substrát ve formě aglykonu nebo glykosidu; struktura cukerné části glykosidu: přítomnost primární alkoholické skupiny, mono- nebo disacharid)^[82,83,84,85] a samozřejmě v případě jediného typu substrátu také vlastní volbou použité lipasy. Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím regioselektivitu lipas je vzájemný poměr použitého enzymu vůči substrátu, případně také poměr donoru, popř. akceptoru acylu vůči enzymu a substrátu.^[83]

Důležitým požadavkem při těchto biotransformačních reakcích je také výtěžek výsledného produktu. Vzhledem k reverzibilitě reakcí katalyzovaných lipasami není vhodné využívat jako donor acylu při syntéze esterů volnou karboxylovou kyselinu, neboť voda uvolněná při reakci může následně způsobovat hydrolýzu vzniklého esteru.^[24,51] Podobně nežádoucí efekt má však také použití jednoduchého esteru kyseliny jako donoru acylu (methyl-, popř. ethyl-ester). Zmíněné nedostatky lze vyřešit použitím vinyl-esterů kyselin, kdy uvolněný vinyl-alkohol okamžitě přesmykuje na acetaldehyd, který již nemůže vstupovat do reakce jako sekundární substrát a reakce je vzhledem k posunu termodynamické rovnováhy prakticky ireverzibilní.^[51]

3 CÍLE PRÁCE

Základní cíle předkládané diplomové práce byly následující:

1. Vypracování literární rešerše na zadané téma.
2. Na základě známých semisyntetických modifikací silybinu (přírodní směsi dvou diastereoisomerů) vybrat takovou, jež bude vhodná pro následné testování diastereoselektivní diskriminace příslušných derivátů silybinu pomocí vhodných enzymů (např. glykosidas, lipas).
3. V případě nalezení vhodné chemoenzymové metody se pokusit o dělení diastereoisomerů silybinu v preparativním měřítku (např. pomocí preparativní sloupcové chromatografie na silikagelu, popř. gelové chromatografie).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité chemikálie

- Silybin (přírodní, směs diastereoisomerů A a B v poměru přibližně 1:1) - *TEVA-Galena, Opava (ČR)* - čistota byla určována pomocí HPLC, v případě potřeby byl silybin přečištěn rekrystalizací z absolutního ethanolu. Silybin byl vysušen azeotropní destilací s toluenem (pro odstranění krystalicky vázané vody) a uchováván v exikátoru nad P_2O_5 .
- Diethyletherát fluoridu boritého (50 % roztok v diethyletheru), dimethyletherát fluoridu boritého (60 % roztok v dimethyletheru), kyselina mravenčí (95 %, p.a.), acetanhydrid, D-manosa, oxalylchlorid (2 mol.l^{-1} roztok v dichlormethanu) – *Aldrich (USA)*, jód - *Lachema (ČR)*,
- molekulární síto 4\AA – *Merck (SRN)*,
- NaHCO_3 (p.a.), Na_2SO_4 (bezv., p.a.), HCl (35 – 38 %), NaCl - *Lachema (ČR)*.

Všechny chemikálie byly čistoty p.a. nebo vyšší.

Rozpouštědla

Ethyl-acetát, chloroform, ethanol, toluen, dichlormethan, acetonitril, pyridin (suchý), tetrahydrofuran (suchý) - *Fluka (Švýcarsko)*, methanol - *Merck (SRN)*, dimethylsulfoxid - *Penta (ČR)*.

Všechna rozpouštědla určená pro chemické syntézy (s výjimkou pyridinu a THF) byla před použitím upravena následujícím postupem:

Toluen byl sušen sodíkem (5 g Na na 1 l toluenu) a před použitím byl destilován za přítomnosti sodíku pod argonem.

Dichlormethan byl sušen nad CaH_2 (5 g CaH_2 na 1 l CH_2Cl_2) a destilován z hydridu vápenatého pod argonem a uchován nad molekulovými síty 4\AA .

Acetonitril byl sušen nad CaH_2 (5 g CaH_2 na 1 l CH_3CN) a destilován z hydridu vápenatého pod argonem a uchován nad molekulovými síty 4\AA .

Aceton byl sušen nad bezvodým K_2CO_3 (10 g K_2CO_3 na 1 l acetonu) 12 hodin a bezprostředně před použitím byl destilován z K_2CO_3 .

Ostatní rozpouštědla byla před použitím predestilována, popř. použita bez další úpravy (pokud to umožňovala deklarovaná čistota).

Enzymy, které byly použity při práci, a jejich zdroje jsou uvedeny v *tab. 4*.

Tab. 4: Přehled použitých enzymů

Enzym	Zdrojový organismus	Dodavatel enzymu
lipasa AK	<i>Pseudomonas</i> sp.	Amano (UK)
lipasa PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano
lipasa D	<i>Rhizopus delemar</i>	Amano
lipasa L	<i>Candida lipolytica</i>	Amano
lipasa M	<i>Mucor javanicus</i>	Amano
lipasa F-AP15	<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano
lipasa N	<i>Rhizopus niveus</i>	Amano
lipasa R	<i>Penicillium roquefortii</i>	Amano
lipasa CV	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Amano
lipasa z <i>Rhizopus japonicus</i>	<i>Rhizopus japonicus</i>	Biocatalysts Ltd. (UK)
lipasa CE	<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano
lipasa A	<i>Aspergillus niger</i>	Amano
lipasa GC	<i>Geotrichum candidum</i>	Amano
lipasa z <i>Candida rugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>	Sigma (USA)
lipasa PPL (Porcine pancreas lipase)	Vepřová slinivka	Sigma
Novozym 435	<i>Candida antarctica</i> (lip. B)	Novozymes (Dánsko)
lipasa CAL-A	<i>Candida antarctica</i> (lip. A)	Novozymes
lipasa CAL-B	<i>Candida antarctica</i> (lip. B)	Novozymes
subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i>	Sigma
proteasa N	<i>Bacillus subtilis</i>	Amano
proleather	<i>Bacillus subtilis</i>	Amano
proteasa P	<i>Bacillus subtilis</i>	Amano
kyselá proteasa II	<i>Rhizopus niveus</i>	Amano
acylasa Amano 3000	<i>Aspergillus</i> sp.	Amano
β -D-galaktosidasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	Sigma

Pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byl použit silikagel 60 F₂₅₄ na hliníkové fólii – Merck (SRN).

Pro preparativní sloupcovou chromatografii byl použit silikagel 40 – 63 μ m – Merck (SRN).

4.2 Použité přístroje a metody

Termomixer - *Thermomixer comfort* - *Eppendorf (SRN)*

Třepačka - *KS 4000 i control* - *Ika (SRN)*

Centrifuga - *5804 R* - *Eppendorf (SRN)*

4.2.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla využita ke sledování průběhu všech reakcí a separací. Pro detekci acyl derivátů silybinu byla použita mobilní fáze CHCl_3 /aceton/ HCOOH (9:2:1, v/v), pro detekci glykosidů petrolether/ethyl-acetát (1:1 (v/v)) s přidavkem HCOOH (1 %) a pro detekci derivátů vzniklých z pentaacetylsilybinu CHCl_3 /aceton/toluen/ HCOOH (12:1:1:1, v/v). Detekce byla prováděna nejprve pod ultrafialovou lampou ($\lambda = 254 \text{ nm}$), poté postřikem roztokem 5 % H_2SO_4 v ethanolu a následnou mineralizací zahřátím.

4.2.2 Preparativní sloupcová chromatografie na silikagelu

Rozměry použité kolony pro chromatografii byly voleny vzhledem k množství separované směsi (obvykle bylo použito padesátinásobné množství silikagelu na dané množství separované směsi - w/w). Průtok mobilní fáze byl urychlen přetlakem vzduchu 0,001-0,002 MPa („flash“ chromatografie), složení mobilní fáze je uvedeno u jednotlivých postupů. Průběh separace byl sledován pomocí TLC. Separovaná směs byla na kolonu nanášena v podobě roztoku v mobilní fázi. V případě problému s rozpustností byl ke směsi přidán silikagel a snadno odpařitelné rozpouštědlo, ve kterém se daná směs dobře rozpouštěla (nejčastěji aceton) a po odpaření byla směs adsorbovaná na silikagelu nasypána na sloupec silikagelu v koloně.

4.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Byl použit přístroj Spectra Physics (*San Jose, USA*) s ternární gradientovou pumpou SP 8800, autosamplrem SP 8800 a UV/VIS skenovacím detektorem Spectra Focus. Pro detekci galaktosidů silybinu byla použita kolona Chromolith RP-18e (50 mm \times 4,6 mm), s předkolonou Chromolith (5 mm \times 4,6 mm) (obě - *Merck, SRN*). Průtok mobilní

fáze byl 1,2 ml/min. Byly použity dvě mobilní fáze o složení A: methanol/voda (42:58; v/v) s přídatkem 0,1 % TFA, B: methanol/TFA (100/0,1; v/v). Silybiny **1a** a **1b** byly eluovány isokraticky, za použití mobilní fáze A (retenční časy: $t_r(\mathbf{1a}) = 3,1$ min a $t_r(\mathbf{1b}) = 3,9$ min). Galaktosidy silybinu **8a** a **8b** byly eluovány pomocí lineárního gradientu 0–40 % B během 10 min ($t_r(\mathbf{8a}) = 8,0$ min a $t_r(\mathbf{8b}) = 7,4$ min)). Teplota kolony byla 25 °C. Detekce byla prováděna při vlnové délce 285 nm, „skenovaná“ oblast byla 200–360 nm.

Pro stanovení acyl derivátů silybinu byl použit přístroj Shimadzu Prominence LC analytical system s binární pumpou Shimadzu LC-20AD, chladícím autosamplerem Shimadzu SIL-20AC, s detektorem diodové pole Shimadzu SPD-20MA (*Shimadzu, Kyoto, Japonsko*). Byla použita monolitická kolona Chromolith SpeedROD, RP-18e (50 × 4,6 mm) s předkolonou (5 × 4,6 mm) (*Merck, SRN*), s průtokem mobilní fáze 0,9 ml/min o složení CH₃CN/MeOH/H₂O/TFA (2:37:61:0,1). Teplota kolony byla 25 °C. Detekce byla prováděna při vlnové délce 285 nm, „skenovaná“ oblast byla 200–360 nm.

$t_r(\text{silybin A}) = 6,1$ min, $t_r(\text{silybin B}) = 7,1$ min, $t_r(23\text{-}O\text{-acetyl-silybin A}) = 23,5$ min, $t_r(23\text{-}O\text{-acetyl-silybin B}) = 25,9$ min.

4.2.4 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

NMR spektra byla měřena na přístrojích Varian INOVA-400 a Bruker Avance III 400 (pozorovací frekvence 399,87 MHz pro ¹H, 100,56 MHz pro ¹³C) v *d*₆-DMSO při 30 °C. NMR spektra měřili Ing. Petr Sedmera, CSc. a Ing. Marek Kuzma, PhD. z MBÚ AV ČR, v.v.i.

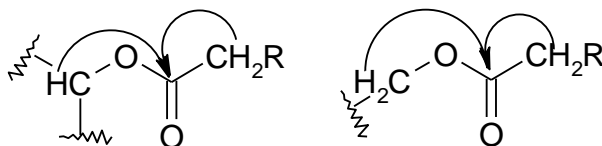
Pro 2D NMR experimenty (HOM2DJ, gCOSY, ROESY, gHSQC, případně gHMBC) byly použity pulsní sekvence z programového souboru ChemPack 3.1. Písmeno g u zkratky sekvence označuje její gradientovou verzi.

Vzhledem k tomu, že jako výchozí látky bylo použito přírodního silybinu (tzn. směsi diastereoisomerů A a B přibližně v poměru 1:1), byly některé signály v NMR spektrech zdvojeny. U ¹H NMR to může komplikovat jejich interpretaci. Ke zjištění „správné“ multiplicity signálů bylo třeba využít experimentů HOM2DJ a COSY. Výhodné bylo také zjednodušení spekter dvojnásobné resonance při „dekaplingu“ protonů hydroxylových skupin 23-OH či 3-OH. Rozdíly mezi chemickými posuny uhlíků diastereoisomerů silybinu nepřevyšují desítky ppb. To znamená, že mimodiagonální

signály obou složek v heterokorelovaných spektrech (HSQC, HMQC, HMBC) jsou společné, takže příslušné strukturní důkazy jsou proveditelné i u studovaných směsí.

Rozpustnost silybinu v organických rozpouštědlech je velmi malá. Jeho NMR spektra lze měřit v methanolu, acetonu a dimethylsulfoxidu. Vzhledem k tomu, že DMSO zaručuje pozorování signálů hydroxylových protonů, byla většina měření provedena v tomto rozpouštědle. Multiplicita signálů hydroxylových skupin pak dovoluje určit jejich typ: singlet znamená terciární hydroxyl, dublet sekundární hydroxyl, triplet primární hydroxyl. Interakce s protonem na uhlíku, na nějž je hydroxyl vázán, prokazatelná „dekaplingem“ nebo COSY experimentem, umožňuje nalézt příslušné místo v molekule. Signály protonů OH skupin lze snadno identifikovat pomocí HSQC či HMQC, neboť v těchto spektrech nekorelují s žádným uhlíkovým signálem. Kromě toho tyto protony také poskytují tzv. výměnné (pozitivní) mimodiagonální signály navzájem a se zbytkovým signálem vody v dimethylsulfoxidu v ROESY spektrech.

K určení polohy acylu v molekule silybinu sloužila znalost úplného přiřazení signálů protonů a uhlíků v ^1H a ^{13}C NMR spektrech. Nejjednodušším způsobem bylo ověření přítomnosti signálů hydroxylových protonů v ^1H NMR spektru derivátu. Chybějící signál totiž ukazuje na místo substituce. Důležitým argumentem jsou tzv. acylační posuny signálů v místě substituce a jeho bezprostředním okolí. Signály H-3 a H-23 se oproti silybinu výrazně posouvají k nižšímu poli (k vyšším hodnotám chemických posunů). Patrný je rovněž obdobný posun signálů příslušných uhlíků (C-3, C-23). U substituce fenolických hydroxylů (7-OH, 20-OH) lze využít jen uhlíkových signálů; ty se však posouvají k vyššímu poli. Přímým důkazem, použitelným pouze u substituce v polohách 3 a 23, je korelace protonu v místě substituce (H-3, H-23) a α -protonů acylu k témuž karbonylu, pozorovaná v HMBC experimentu (*obr 8*).



Obr. 8: Korelace protonů v místě substituce (u H-3 a H-23) a α -protonů acylu ke karbonylu v HMBC experimentu

Jako dalších podpůrných argumentů bylo použito srovnání chemických posunů jader vodíku a uhlíku s hodnotami pro výchozí silybin, které se opíralo o experimentální

přiřazení založené na COSY a HSQC. Na základě experimentálních údajů lze konstatovat, že ke změnám chemických posunů dochází právě v okolí místa substituce.

4.2.5 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Vznik iontů – výběr metody užití ke generaci iontů závisí na dvou faktorech. Prvním z nich je těkavost a druhým je účel měření. Pro interpretaci hmotnostního spektra je důležitá míra fragmentace závisící na množství energie, kterou molekula získá v průběhu ionizace. Účelem měření může být buď určení molekulové hmotnosti (potom o hlubší fragmentaci nemáme zájem), nebo odvození struktury studované látky z její charakteristické fragmentace.

Molekulová hmotnost připravených látek byla měřena na LC^QDECA spektrometru (*ThermoQuest, San Jose, USA*) nebo na hmotnostním spektrometru BIFLEX II (*Bruker-Franzen, Brémy, Německo*). MS spektra měřil RNDr. Miroslav Šulc, PhD.

Při měření na LC^QDECA spektrometru byla ke generování pozitivních iontů použita ionizace elektrosprejem (ESI) při ionizačním napětí 1,2 kV a napětí čočky 30 V.

Vzorky, které byly rozpuštěny v 30 % roztoku acetonitrilu s 1 % kyseliny mravenčí, byly vnášeny do ESI iontového zdroje pomocí lineární pumpy rychlostí 3 µl/min. Kapilára byla udržována při 150 °C a potenciálu 10 V. Spektra byla získána při m/z rozsahu 150-1000 Da.

Pokud bylo měřeno na hmotnostním spektrometru BIFLEX II (*Bruker-Franzen, Brémy, Německo*) s desorpčí a ionizací laserem za přítomnosti matrice MALDI-TOF MS, jako MALDI matrice byla použita kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (10 mg/ml v 50 % acetonitrilu/0,2 % TFA). Spektra byla měřena v hmotnostním rozsahu m/z 0-2500 Da. Spektrometr byl kalibrován externě pomocí $[M+H]^+$ iontů MALDI matrice (m/z = 190,1 Da) a peptidového standardu bombesinu (m/z = 1619,8 Da).

4.3 Využití glykosidas pro separaci diastereoisomerů silybinu

4.3.1 Syntéza derivátů silybinu

4.3.1.1 Příprava 23-*O*-β-D-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl)-galaktopyranosyl-silybinu (**8**)

Galaktosid silybinu **8** byl připraven reakcí silybinu (**1**) s pentaacetyl-β-D-galaktosou postupem popsaným v literatuře.^[49]

4.3.1.2 Příprava 23-*O*-β-D-galaktopyranosyl-silybinu (**13**)

23-*O*-β-D-(2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetyl)-galaktopyranosyl-silybin (**8**; 87 mg; 0,11 mmol; směs A+B) byl rozpuštěn ve směsi Et₃N/MeOH/H₂O (5 ml; 1:8:1; v/v). Reakční směs byla míchána při teplotě 30 °C po dobu 36 h, průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Odpařením rozpouštědel byl získán prakticky čistý 23-*O*-β-D-galaktopyranosyl-silybin (**13**; 57 mg; 88,5 %).

4.3.1.3 Příprava penta-*O*-acetyl-β-D-manosy (**14**)

Penta-*O*-acetyl-β-D-manosa byla připravena reakcí D-manosy s acetanhydridem v přítomnosti jódu postupem popsaným v literatuře.^[86]

4.3.1.4 Pokus o přípravu 23-*O*-β-D-(2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl)-manopyranosyl-silybinu (**15**)

K roztoku silybinu (**1**; 1,7 g; 3,52 mmol) a 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl-β-D-manopyranosy (2,1 g; 5,28 mmol) ve směsi rozpouštědel CH₂Cl₂/CH₃CN (60 ml; 1:1; v/v) byl přidán BF₃·Me₂O (0,645 ml; 4,22 mmol; 60 % roztok (v/v) v dimethyletheru). Reakční směs byla míchána 2 h při laboratorní teplotě a poté nalita na nasycený roztok NaHCO₃ (50 ml) s ledem a extrahována ethyl-acetátem (2 × 100 ml). Organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NaCl (50 ml), vysušena bezvodým Na₂SO₄ a odpařena na vakuové odparce. Reakcí byla získána neseparovatelná směs produktů.

4.3.2 Využití β -D-galaktosidasy pro diskriminaci diastereoisomerů silybinu

23-*O*- β -D-Galaktopyranosyl-silybin (**13**; 57 mg; 0,091 mmol) byl rozpuštěn ve směsi Mc Ilvainova pufru/methanolu (100:1; 5,5 ml; v/v) s přidavkem enzymu (0,2 a 2 mg). Reakce byla sledována pomocí TLC s mobilní fází ethyl-acetát/MeOH/H₂O/HCOOH (77:13:10:0,5). Vzorky reakční směsi byly odebírány v časovém intervalu 0 - 48 h, jejich příprava na HPLC analýzu spočívala v povaření vzorku (300 μ l; 5 min; 100 °C) a jeho naředění dimethylsulfoxidem (1:1; v/v).

4.4 Využití lipas pro separaci diastereoisomerů silybinu

4.4.1 Příprava esterů silybinu

4.4.1.1 Příprava 23-*O*-acetyl-silybinu (**12**) – metoda A

K roztoku silybinu (**1**; 1,5 g; 3,12 mmol) v suchém THF (75 ml) byl přidán acetanhydrid (2,3 ml; 24,3 mmol) a BF₃·Et₂O (1,5 ml; 5,97 mmol, 50 % roztok v diethyletheru). Reakční směs byla míchána 1 h při teplotě 0 °C v inertní atmosféře (Ar). Poté byla reakční směs nalita na nasycený roztok NaHCO₃ (50 ml) s ledem a extrahována ethyl-acetátem (2 \times 50 ml). Organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NaCl (50 ml), vysušena bezvodým Na₂SO₄ a odpařena na vakuové odparce. Chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: CHCl₃/aceton/HCOOH – 95:5:1) byl získán **12** (985 mg; 60 %) ve formě nažloutlé amorfnní látky. ¹H a ¹³C NMR data byla ve shodě s dříve uvedenými.^[23] MALDI MS (*m/z*): 547 [M + Na]⁺. Vypočtené *m/z* látky **12** je 547,1 [M + Na]⁺.

4.4.1.2 Příprava 23-*O*-acetyl-silybinu (**12**) – metoda B

K roztoku silybinu (**1**; 4,5 g; 9,3 mmol) v ethyl-acetátu (225 ml) byl přidán BF₃·Et₂O (4,5 ml; 17,9 mmol; 50 % (v/v) roztok v diethyletheru). Reakční směs byla míchána 24 h pod refluxem, reakce byla sledována pomocí TLC (mobilní fáze: CHCl₃/aceton/HCOOH - 9:2:1). Poté byla reakční směs nalita na nasycený roztok NaHCO₃ (100 ml) s ledem, obě vzniklé fáze byly odděleny a vodná fáze byla extrahována ethyl-acetátem (2 \times 50 ml). Spojené organické fáze byly následně promyty nasyceným roztokem

NaCl (100 ml), vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny na vakuové odparce. Chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: CHCl₃/aceton/HCOOH – 95:5:1) byl získán ester **12** (4,4 g; 89,9 %) jako nažloutlá amorfnní látka. Struktura byla potvrzena pomocí NMR a MS analýzy.

4.4.1.3 Příprava 23-*O*-acetyl-silybinu (**12**) – metoda C

Novozym 435 (9 g; ≥ 10000 U/g) byl přidán k roztoku silybinu (**1**; 30 g; 62,19 mmol) ve směsi aceton/vinyl-acetát (900 mL; 9:1; v/v). Reakční směs byla protřepávána při 35 °C a 650 rpm po dobu 48 h, a poté byla filtrována přes fritu S2 (pro odstranění imobilizovaného enzymu). Filtrát byl odpařen do sucha a krystalizován z methanolu. Krystalizací byl získán čistý **12** (30,0 g; 92 %) ve formě bílých mikrokrytalů. Struktura byla potvrzena pomocí NMR a MS analýzy.

4.4.1.4 Příprava 23-*O*-butanoyl-silybinu (**16**)

K roztoku silybinu (**1**; 750 mg; 1,555 mmol) ve směsi rozpouštědel CH₃CN/CH₂Cl₂ (75 ml, 1:1, v/v) byl přidán butanoyl-chlorid (0,153 ml; 1,464 mmol) a následně BF₃·Et₂O (0,465 ml; 1,851 mmol; 50 % (v/v) roztok v diethyletheru). Reakční směs byla míchána 2 h při teplotě 0 °C, následně byl přidán další podíl butanoyl-chloridu (0,153 ml; 1,464 mmol) a BF₃·Et₂O (0,465 ml; 1,851 mmol) a míchání pokračovalo při laboratorní teplotě ještě 1 h. Poté byla reakční směs nalita na nasycený roztok NaHCO₃ (50 ml) s ledem a extrahována ethyl-acetátem (2 × 50 ml). Organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NaCl (50 ml), vysušena bezvodým Na₂SO₄ a odpařena na vakuové odparce. Chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: CHCl₃/aceton/HCOOH - 95:5:1) byl získán čistý 23-*O*-butanoyl-silybin (**16**; 258 mg; 22,5 %) jako nažloutlá amorfnní látka. ¹H a ¹³C NMR data byla ve shodě s literaturou.^[23] HR-MS (MALDI) vypočteno pro C₂₉H₂₈O₁₁ (M⁺): 552,1632; nalezeno: 552,1615.

4.4.1.5 Příprava 23-*O*-oktanoyl-silybinu (**17**)

23-*O*-Oktanoyl-silybin (**17**) byl získán analogickým způsobem jako ester **16** ve výtěžku 24 %. ¹H a ¹³C NMR data byla ve shodě s dříve uvedenými.^[23] HR-MS (MALDI) vypočteno pro C₃₃H₃₆O₁₁ (M⁺): 608,2258; nalezeno: 608,2241.

4.4.2 Stanovení optimálního množství enzymu (Novozym 435) pro hydrolýzu 23-O-acetyl-silybinu

23-*O*-Acetyl-silybin (**12**; 300 mg; 0,572 mmol) byl rozpuštěn ve směsi TBME/*n*-butanol (9:1; 40 ml), s přidavkem Novozymu 435 (10 %; 15 % a 20 % (w) enzymu vůči substrátu). Každá z reakčních směsí byla inkubována při teplotě 45 °C po dobu 40 h při frekvenci třepání 450 rpm a poté byla filtrována přes fritu typu S2 (pro odstranění imobilizovaného enzymu). Filtrát byl odpařen do sucha a vzorek reakční směsi byl analyzován pomocí HPLC.

23-*O*-Acetyl-silybin (**12**, 300 mg, 0,572 mmol) byl rozpuštěn ve směsi toluen/*n*-butanol (9:1; 40 ml), s přidavkem Novozymu 435 (15 %; 30 %; 45 % a 60 % (w) enzymu vůči substrátu). Jednotlivé reakční směsi byly inkubovány (45 h; 45 °C; 450 rpm) a poté filtrovány přes fritu typu S2. Jednotlivé filtráty byly odpařeny do sucha a vzorky reakčních směsí byly analyzovány pomocí HPLC.

4.4.3 Kinetika hydrolýzy 23-O-acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 v TBME a toluenu

23-*O*-Acetyl-silybin (**12**; 300 mg; 0,572 mmol) byl rozpuštěn ve směsi TBME (resp. toluen)/*n*-butanol (9:1; 40 ml), s přidavkem Novozymu 435 (15 %, resp. 30 % (w) enz./substrát). Reakční směs byla inkubována při teplotách 45 °C a 35 °C (při 450 rpm). V pravidelných časových intervalech bylo odebíráno 100 µl vzorku, ten byl odpařen do sucha a analyzován pomocí HPLC.

4.4.4 Příprava opticky čistého silybinu A v preparativním měřítku

Novozym 435 (4,5 g; ≥ 10000 U/g, 15 % (w/w)) byl přidán k roztoku 23-*O*-acetyl-silybinu (**12**; 30 g; 57,2 mmol) ve směsi TBME/*n*-butanol, 9:1 (1,2 l) a směs byla protřepávána při teplotě 45 °C a 170 rpm po dobu 42 h. Následně byl enzym odstraněn filtrací, filtrát byl odpařen a surová reakční směs byla přečištěna preparativní sloupcovou chromatografií na silikagelu (CHCl₃/aceton/HCOOH, 90:10:1), po níž byl získán silybin B (**1b**; 17,93 g; 65 %; d.e. = 44 %), který byl dále použit v následující proceduře pro získání opticky čistého silybinu B a dále 23-*O*-acetyl-silybin A (**12a**; 9,73 g; 32 %; d.e. = 97 %).

Takto získaný 23-*O*-acetyl-silybin A (**2a**; 9,73 g; 18,55 mmol) byl opět rozpuštěn ve směsi TBME/*n*-butanol, 9:1 (600 ml; v/v), poté byl přidán Novozym 435 (9,73 g; ≥ 10000 U/g; 100 % (w/w)) a reakční směs byla protřepávána při 35 °C a 170 rpm po dobu 100 h. Enzym byl odfiltrován, filtrát odpařen a hrubý produkt byl krystalizován ze směsi MeOH/H₂O. První podíl z krystalizace poskytl silybin A (1,71 g; 19 %) o poměrně nízké optické čistotě (d.e. = 72 %). Druhá krystalizace zbylého matečného roztoku ze stejné směsi rozpouštědel již vedla k získání poměrně vysoce čistého produktu **1a** (3,7 g; 41 %, d.e. = 98 %) ve formě bílých mikrokrytalů. Matečný roztok po druhé krystalizaci byl dále přečištěn chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: CHCl₃/aceton/HCOOH - 90:10:1), po níž byl získán další podíl **1a** (2,58 g; 29 %; d.e. = 90 %). Celkový výtěžek silybinu A (**1a**) o d.e. ≥ 95 % byl 6,28 g (45,6 % vztaženo na výchozí látku **12**).

NMR a MS data potvrdila, že se jedná o silybin. Totožnost silybinu A byla prokázána na základě specifické optické rotace: $[\alpha]_D^{27} = +16,33$ (c = 0,3; aceton).

4.4.5 Příprava opticky čistého silybinu B v preparativním měřítku

Metoda A:

Novozym 435 (400 mg; ≥ 10000 U/g; 30 % (w/w) (enz./substrát)) byl přidán k roztoku 23-*O*-acetyl-silybinu (**12**; 1,2 g; 2,49 mmol) ve směsi toluen/*n*-butanol, 9:1 (40 ml; v/v) a směs byla protřepávána při 45 °C a 650 rpm po dobu 48 h. Následně byl enzym odstraněn filtrací, filtrát byl odpařen a surová reakční směs byla přečištěna preparativní sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: CHCl₃/aceton/HCOOH - 90:10:1), po níž byl získán silybin B (**1b**; 330 mg; 30 %; d.e. = 84 %) a 23-*O*-acetylsilybin A (**12a**; 840 mg; 70 %; d.e. = 32 %). Získaný **1b** (330 mg; d.e. = 84 %) byl enzymově acetylován (metoda C přípravy **12**), přičemž byl získán opticky obohacený 23-*O*-acetyl-silybin B (**12b**; 358 mg; 0,682 mmol; 100 %; d.e. = 84 %). **2b** byl opět podroben hydrolýze Novozymem 435 (107 mg; 30 % (w/w) (enz./substrát)) ve směsi toluen/*n*-butanol, 9:1 (15 ml; v/v) a směs byla protřepávána při teplotě 45 °C a 650 rpm po dobu 48 h. Následně byl enzym odstraněn filtrací, filtrát byl odpařen a surová reakční směs byla přečištěna preparativní sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: CHCl₃/aceton/HCOOH - 90:10:1), po níž byl získán silybin B (**1b**; 171 mg; 52 %; d.e. = 97 %) a 23-*O*-acetyl-silybin B (**12b**; 165 mg; 46 %; d.e. = 58 %).

NMR a MS data potvrdila, že se jedná o silybin. Totožnost silybinu B byla prokázána na základě specifické optické rotace: $[\alpha]_D^{27} = + 3,96$ ($c = 0,3$; aceton).

Metoda B:

Opticky obohacený silybin B (**1b**; 17,93 g; 37,17 mmol; d.e. = 44 %) získaný při přípravě silybinu A byl acetylován (metodou C přípravy **12**) za vzniku 23-*O*-acetyl-silybinu B (**12b**; 19,5 g; 37,17 mmol; 100 %; d.e. = 44 %). **2b** byl následně podroben hydrolýze Novozymem 435 (5,85 g; 30 % (w/w) (enz./substrát)) ve směsi toluen/*n*-butanol (900 ml, 9:1, v/v) a směs byla protřepávána při teplotě 45 °C a 170 rpm po dobu 48 h. Poté byl enzym odstraněn filtrací, filtrát byl odpařen a surová reakční směs byla přečištěna preparativní sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: CHCl₃/aceton/HCOOH - 90:10:1), po níž byl získán silybin B (**1b**; 10,04 g; 56 %; d.e. = 95 %) a 23-*O*-acetyl-silybin A (**12a**; 7,02 g; 36 %; d.e. = 32 %), který byl dále zpracován metodou pro přípravu silybinu A.

4.4.6 Kovalentní modifikace Novozymu 435

4.4.6.1 Acetylace Novozymu 435

Acetylace Novozymu 435 byla provedena postupem popsáným v literatuře,^[78] reakcí Novozymu 435 s acetanhydridem v nasyceném roztoku octanu sodného.

4.4.6.2 Sukcinylace Novozymu 435

Sukcinylovaný Novozym 435 byl připraven postupem popsáným v literatuře,^[78] reakcí Novozymu 435 s anhydridem kyseliny jantarové v hydrogenfosforečnanu sodném (50 mM; pH = 8).

4.4.6.3 Hydroxyethylamidace Novozymu 435

K hydroxyethylamidaci Novozymu 435 byla využita metoda popsaná v literatuře,^[78] jež spočívala v reakci Novozymu 435 s ethanolaminem (pH = 4,75).

4.4.7 Zhodnocení efektu kovalentních modifikací Novozymu 435 na diastereoselektivitu hydrolýzy 23-O-acetyl-silybinu

23-O-Acetyl-silybin (**12**; 10 mg; 0,02 mmol) byl rozpuštěn ve směsi TBME/n-butanol (10:1; 1,1 ml; v/v), s přidavkem daného modifikovaného Novozymu 435 (20 % resp. 30 % (w/w) enz./substrát). Reakční směs byla inkubována (65 h; 45 °C; 450 rpm), monitorována pomocí TLC a poté byla filtrována přes fritu S2. Filtrát byl odpařen do sucha, vzorek reakční směsi byl analyzován pomocí HPLC.

4.4.8 Využití 3,5,7,20,23-penta-O-acetyl-silybinu jako substrátu pro určení regioselektivity lipas

4.4.8.1 Příprava 3,5,7,20,23-penta-O-acetyl-silybinu (**17**)

3,5,7,20,23-Penta-O-acetyl-silybin byl připraven metodou popsanou v literatuře, pomocí acetanhydridu v pyridinu.^[87] Z 0,5 g silybinu (**1**) bylo získáno 705 mg peracetátu **17** (98,2 %) ve formě nažloutlé amorfnní látky. ¹H a ¹³C NMR data látky **17** jsou uvedena v *tabulkách 5 (str. 48) a 6 (str. 49)*.

4.4.8.2 Testování regioselektivity lipas při hydrolýze 3,5,7,20,23-penta-O-acetyl-silybinu (**17**)

Testované lipasy jsou uvedeny v *tabulce 4 (str. 36)*. 3,5,7,20,23-Penta-O-acetyl-silybin (**17**; 5 mg; 7,2 μmol) byl rozpuštěn ve směsi TBME (resp. toluen)/n-butanol 10:1 (1,1 ml; v/v) s přidavkem odpovídajícího enzymu (5 mg). Reakční směs byla inkubována při 45 °C a 450 rpm, průběh reakcí byl sledován pomocí TLC.

4.4.8.3 Preparativní reakce katalyzovaná lipasou AK

3,5,7,20,23-Penta-O-acetyl-silybin (**17**; 100 mg; 0,144 mmol) byl rozpuštěn ve směsi TBME/n-butanol 10:1 (22 ml; v/v), s přidavkem lipasy AK (100 mg). Reakční směs byla inkubována při teplotě 45 °C, frekvenci třepání 450 rpm po dobu 48 h. Chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: CHCl₃/aceton/toluen/HCOOH – 95:5:5:1) byly získány produkty 3,20,23-tri-O-acetyl-silybin (**18**) (42 mg, 71,4 %) a 3,5,20,23-tetra-O-acetyl-silybin (**19**) (9 mg, 16,7 %) ve formě nažloutlých amorfnních látek. MALDI MS (*m/z*): **18**: 631 [M + Na]⁺, **19**: 673 [M + Na]⁺. Vypočtená *m/z* látky **18**: 631,1 [M + Na]⁺,

látky **19**: 673,2 [M + Na]⁺. ¹H a ¹³C NMR data látek **18** a **19** jsou uvedena v *tabulkách 5 a 6* (str. 49).

Tab. 5: ¹H NMR data látek **17**, **18** a **19** (399.89 MHz, 30 °C)

Atom	19^a	17^b	18^b
2	5,512 (d; <i>J</i> = 12,0 Hz) -	5,363 (d; <i>J</i> = 12,1 Hz) 5,358 (d; <i>J</i> = 12,2 Hz)	5,267 (d; <i>J</i> = 11,7 Hz) 5,259 (d; <i>J</i> = 11,7 Hz)
3	5,740 (d; <i>J</i> = 12,0 Hz) 5,759 (d; <i>J</i> = 12,0 Hz)	5,696 (d; <i>J</i> = 12,1 Hz) 5,674 (d; <i>J</i> = 12,2 Hz)	5,742 (d; <i>J</i> = 11,7 Hz) 5,727 (d; <i>J</i> = 11,7 Hz)
6	6,262 (d; <i>J</i> = 2,3 Hz) -	6,594 (d; <i>J</i> = 2,2 Hz) 6,592 (d; <i>J</i> = 2,3 Hz)	6,094 (d; <i>J</i> = 2,1 Hz) -
8	6,309 (d; <i>J</i> = 2,3 Hz) 6,308 (d; <i>J</i> = 2,3 Hz)	6,790 (d; <i>J</i> = 2,2 Hz) 6,781 (d; <i>J</i> = 2,3 Hz)	5,951 (d; <i>J</i> = 2,1 Hz) 5,946 (d; <i>J</i> = 2,1 Hz)
10	4,632 (ddd; <i>J</i> = 3,0; 5,0; 7,7 Hz) 4,613 (ddd; <i>J</i> = 3,2; 5,1; 7,8 Hz)	4,272 (m) -	4,251 (ddd; <i>J</i> = 3,5; 4,5; 7,9 Hz) 4,220 (ddd; <i>J</i> = 3,4; 4,5; 8,0 Hz)
11	5,116 (d; <i>J</i> = 7,8 Hz) 5,101 (d; <i>J</i> = 7,7 Hz)	4,960 (d; <i>J</i> = 7,9 Hz) 4,950 (d; <i>J</i> = 7,9 Hz)	4,932 (d; <i>J</i> = 8,0 Hz) 4,918 (d; <i>J</i> = 7,9 Hz)
13	7,215 (d; <i>J</i> = 1,7 Hz) -	7,122 (d; <i>J</i> = 1,6 Hz) 7,118 (d; <i>J</i> = 1,8 Hz)	7,124 (dd; <i>J</i> = 0,5; 1,8 Hz) 7,123 (dd; <i>J</i> = 0,5; 1,8 Hz)
15	7,06* (m)	6,99* (m)	6,98* (m)
16	7,028 (d; <i>J</i> = 8,3 Hz)	7,01* (m)	6,98* (m)
18	7,258 (d; <i>J</i> = 1,9 Hz)	7,00* (m)	6,98* (m)
21	7,151 (d; <i>J</i> = 8,1 Hz) 7,147 (d; <i>J</i> = 8,1 Hz)	7,090 (d; <i>J</i> = 8,0 Hz) -	7,085 (d; <i>J</i> = 7,9 Hz) 7,083 (d; <i>J</i> = 8,1 Hz)
22	7,07* (m)	6,97* (m)	6,96* (m)
23	4,146 (dd; <i>J</i> = 3,1; 12,4 Hz) 4,144 (dd; <i>J</i> = 3,2; 12,4 Hz) 3,982 (dd; <i>J</i> = 5,1; 12,4 Hz) -	4,372 (dd; <i>J</i> = 3,3; 12,2 Hz) 4,368 (dd; <i>J</i> = 3,2; 12,2 Hz) 4,018 (dd; <i>J</i> = 4,2; 12,2 Hz) 4,010 (dd; <i>J</i> = 4,3; 12,2 Hz)	4,349 (dd; <i>J</i> = 3,5; 12,3 Hz) 4,345 (dd; <i>J</i> = 3,4; 12,3 Hz) 3,999 (dd; <i>J</i> = 4,5; 12,3 Hz) 3,991 (dd; <i>J</i> = 4,5; 12,2 Hz)
3-OAc	1,960 (s)	2,050 (s)	2,066 (s)
5-OAc	2,258 (s)	2,375 (s)	-
7-OAc	-	2,296 (s)	-
19-OMe	3,794 (s) 3,790 (s)	3,868 (s) 3,860 (s)	3,856 (s) 3,847 (s)
20-OAc	2,266 (s)	2,323 (s)	2,328 (s)
23-OAc	2,009 (s)	2,063 (s)	2,062 (s)
5-OH	-	-	11,457 (br s)
7-OH	7,629 (br s)	-	7,616 (br s)

* odečet z HSQC

^a měřeno v DMSO-*d*₆

^b měřeno v CDCl₃

s – singlet, d – dublet, dd – dublet dubletů, ddd – dublet dublet dubletů, br s – široký signál, m – multiplet, *J* – interakční konstanta

Tab. 6: ^{13}C NMR data látek 17, 18 a 19 (100,55 MHz, 30 °C)

Atom	19 ^a	17 ^b	18 ^b
2	79,66	81,03	80,76
	79,61	80,95	80,68
3	72,85	73,36	72,52
	72,75	73,20	72,42
4	184,51	185,20	191,36
	184,48	-	-
4a	105,29	110,61	101,60
	-	110,59	101,59
5	151,91	151,44	164,24
6	105,72	111,21	97,35
7	164,83	156,37	166,06
	-	156,36	-
8	101,01	108,91	95,85
	-	-	95,84
8a	163,19	162,51	162,39
	163,17	162,48	162,35
10	74,69	75,62	75,59
	-	75,57	75,54
11	75,57	76,39	76,38
	75,52	76,33	76,29
12a	143,16	143,55	143,57
	143,11	143,50	143,50
13	116,66	116,35	116,23
	116,54	116,31	116,19
14	129,09	128,61	128,94
	129,04	128,51	128,86
15	121,50	121,12	121,08
	121,33	120,96	120,94
16	116,80	117,34	117,30
	-	117,27	117,25
16a	143,37	143,91	143,81
	143,33	143,88	143,77
17	134,69	134,33	134,44
	-	-	134,41
18	112,25	111,19	111,20
	112,21	111,09	111,11
19	151,08	151,72	151,66
	151,07	151,67	151,61
20	139,83	140,62	140,52
21	123,02	123,26	123,22
	-	123,21	123,18
22	120,10	119,82	119,84
	120,06	-	-
23	62,34	62,63	62,66
	-	62,61	-
3-OAc	20,24	20,40	20,40
	20,23	20,39	20,39
3-CO	168,72	169,10	169,46
	168,69	169,03	169,42
5-OAc	20,83	20,91	-
5-CO	168,53	169,03	-
7-OAc	-	21,12	-
7-CO	-	167,74	-
19-OMe	55,97	56,05	56,03
	55,94	56,00	55,98
20-OAc	20,41	20,61	20,63
20-CO	168,41	168,65	169,09
	168,40	168,63	169,04
23-OAc	20,42	20,61	20,63
23-CO	170,03	170,33	170,57

^a měřeno v DMSO- d_6 ^b měřeno v CDCl_3

5 VÝSLEDKY

5.1 Využití β -D-galaktosidasy pro separaci diastereoisomerů silybinu

V našich experimentech jsme sledovali závislost množství enzymu a změny reakčních podmínek na diastereoselektivitu β -D-galaktosidasy. Zjistili jsme, že použitý substrát 23-O- β -D-galaktopyranosyl-silybin (**13**) je přeměňován β -D-galaktosidasou bez výrazné diastereopreference (nízké hodnoty *E*).

Tab. 8: Stanovení diastereoselektivity β -D-galaktosidasy (2 mg enzymu)

	čas(min)				
	0*	15	30	45	60
Konverze (%)	4,55	24,16	52,42	61,83	62,17
<i>E</i>	1,9	1,4	1,5	1,5	1,5

* - čas 0 min označuje vzorek, který byl odebrán bezprostředně po přidavku enzymu do reakční směsi a ihned poté zpracován postupem pro přípravu vzorků na HPLC analýzu, proto není konverze 0, ale vyšší.

Výpočet konverze a diastereoselektivity ukázal, že reakce po 30 min dosahuje konverze cca 25 %, po 1 h již 61 % (tab. 8.). Jak je vidět z hodnot *E*, selektivita není příliš výrazná. Pro přesnější stanovení bylo množství enzymu sníženo zhruba 10 × oproti původnímu. Tím došlo k zamýšlenému zpomalení reakce, kdy konverze 50 % bylo dosaženo po asi 3 h (tab. 9).

Tab. 9: Stanovení diastereoselektivity β -D-galaktosidasy (0,2 mg enzymu)

	čas (min)								
	0*	15	30	45	60	75	90	120	180
Konverze (%)	1,11	5,38	9,72	16,93	19,89	23,52	28,87	38,03	42,27
<i>E</i>	1,4	1,7	1,5	1,1	1,1	1,6	1,6	1,5	1,7

* - čas 0 min označuje vzorek, který byl odebrán bezprostředně po přidavku enzymu do reakční směsi a ihned poté zpracován postupem pro přípravu vzorků na HPLC analýzu, proto není konverze 0, ale vyšší.

5.2 Využití lipas pro separaci diastereoisomerů silybinu

5.2.1 Stanovení optimálního množství enzymu (Novozym 435) pro hydrolýzu 23-O-acetyl-silybinu

V další práci jsme se zaměřili na sledování závislosti množství enzymu na průběh hydrolýzy 23-O-acetyl-silybinu ve směsi rozpouštědel TBME/n-butanol. Cílem experimentu bylo určení minimálního množství enzymu, při němž bude dosaženo optimální konverze hydrolýzy spolu s co nejvyšší hodnotou d.e. (diastereoisomerní přebytek) produktu, popř. substrátu. Zároveň by tohoto poměru mělo být dosaženo v čase, který by neměl překročit 48 h, neboť jak substrát tak také produkt jsou náchylné k oxidačním a polymerizačním reakcím. Proto je nezbytné volit podmínky reakce tak, aby byly obě látky v kontaktu s rozpouštědly co nejkratší dobu. Reakci lze provádět v analytickém měřítku prakticky s libovolným množstvím enzymu, je však potřeba volit předem podmínky tak, aby byly snadno převeditelné i do preparativního měřítko (jednotky až desítky gramů), kdy již množství použitého enzymu hraje z ekonomického hlediska nezanedbatelnou roli. Výsledek je tak jistým kompromisem mezi minimálním množstvím enzymu schopným docílit 50 % konverze substrátu a dobou reakce, která by neměla přesáhnout 48 h.

Pro vlastní reakci bylo použito 10, 15 a 20 % (w) Novozymu 435, hydrolýza probíhala při 45 °C po dobu 40 h, kdy byla reakce ukončena a vzorek reakční směsi byl analyzován pomocí HPLC. Reakce v této směsi rozpouštědel vede vždy ke směsi poměrně čistého 23-O-acetyl-silybinu A (**12a**) a diastereoisomerně obohaceného silybinu B (**1b**). Nejlepší diastereoisomerní čistoty (vyjádřené ve formě d.e.) a zároveň výtěžku jak **12a**, tak i **1b** je za těchto podmínek dosaženo za použití 15 % (w/w) enzymu vůči substrátu (*tab. 10, str. 52*).

Tab. 10: Vliv množství Novozymu 435 na průběh hydrolýzy substrátu (TBME/n-butanol, 45 °C)

Množství enzymu [% (w/w)]	10	15	20
složka	obsah [%]	obsah [%]	obsah [%]
Silybin A	8,8	11,1	15,4
Silybin B	38,9 (63)	48,7 (63)	48,3 (52)
23- <i>O</i> -Acetylsilybin A	48,2 (85)	38,9 (94)	34,5 (91)
23- <i>O</i> -Acetylsilybin B	3,8	1,2	1,7

- v závorkách je uvedena hodnota d.e. [%] pro převažující diastereoisomer.

V dalších experimentech jsme sledovali závislost množství enzymu na diastereoselektivitě hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu ve směsi toluen/n-butanol. Použitá množství Novozymu 435 byla 15, 30, 45 a 60 % (w/w) vůči substrátu. Cílem experimentu bylo opět určení minimálního množství enzymu pro dosažení optimálního poměru konverze substrátu a d.e. v daném časovém intervalu (< 48 h). Oproti předchozí směsi rozpouštědel (TBME/n-butanol) vede reakce za těchto podmínek ke směsi poměrně čistého silybinu B (**1b**) a diastereoisomerně obohaceného 23-*O*-acetyl-silybinu A (**12a**). Nejlepší diastereoisomerní čistoty (vyjádřené ve formě d.e.) a zároveň výtěžku jak **1b**, tak i **12a** je za těchto podmínek dosaženo za použití 30 % (w) enzymu vůči substrátu (*tab. 11*).

Tab. 11: Vliv množství enzymu na průběh hydrolýzy substrátu (toluen/n-butanol, 45 °C)

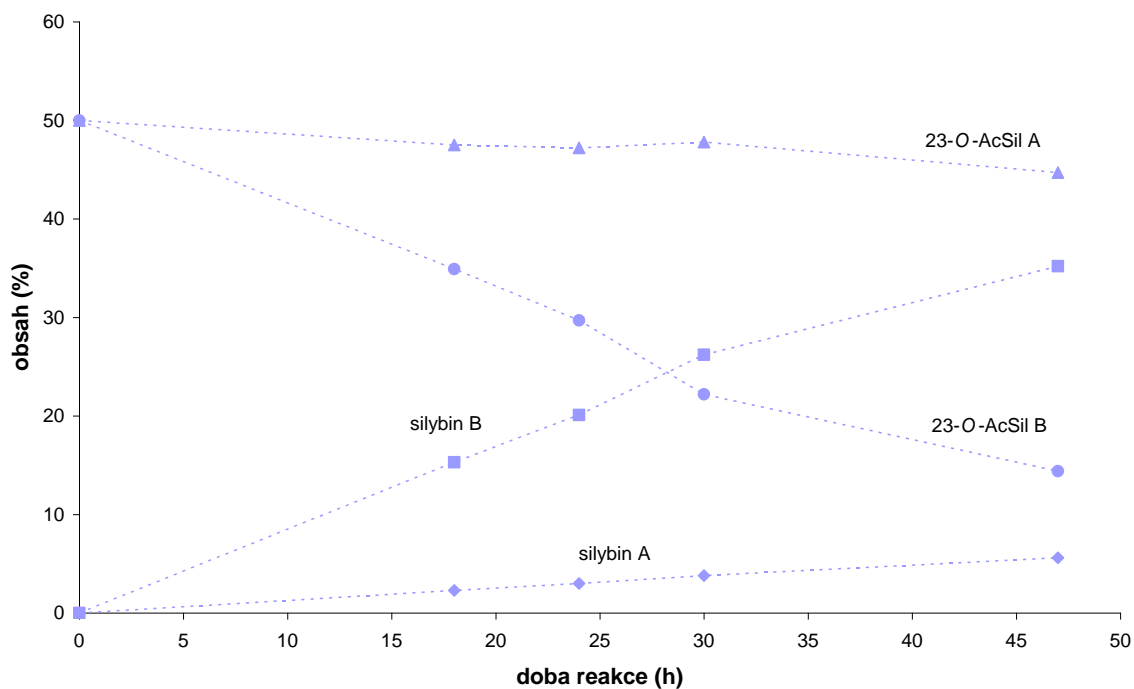
Množství enzymu [% w/w]	15	30	45	60
Složka	obsah [%]	obsah [%]	obsah [%]	obsah [%]
Silybin A	2,6	7,9	9,7	13,9
Silybin B	30,5 (84)	45,8 (71)	47,6 (66)	48,2 (55)
23- <i>O</i> -Acetylsilybin A	46,4 (41)	41,9 (81)	39,9 (89)	36,2 (91)
23- <i>O</i> -Acetylsilybin B	19,4	4,2	2,3	1,7

- v závorkách je uvedena hodnota d.e. [%] pro převažující diastereoisomer

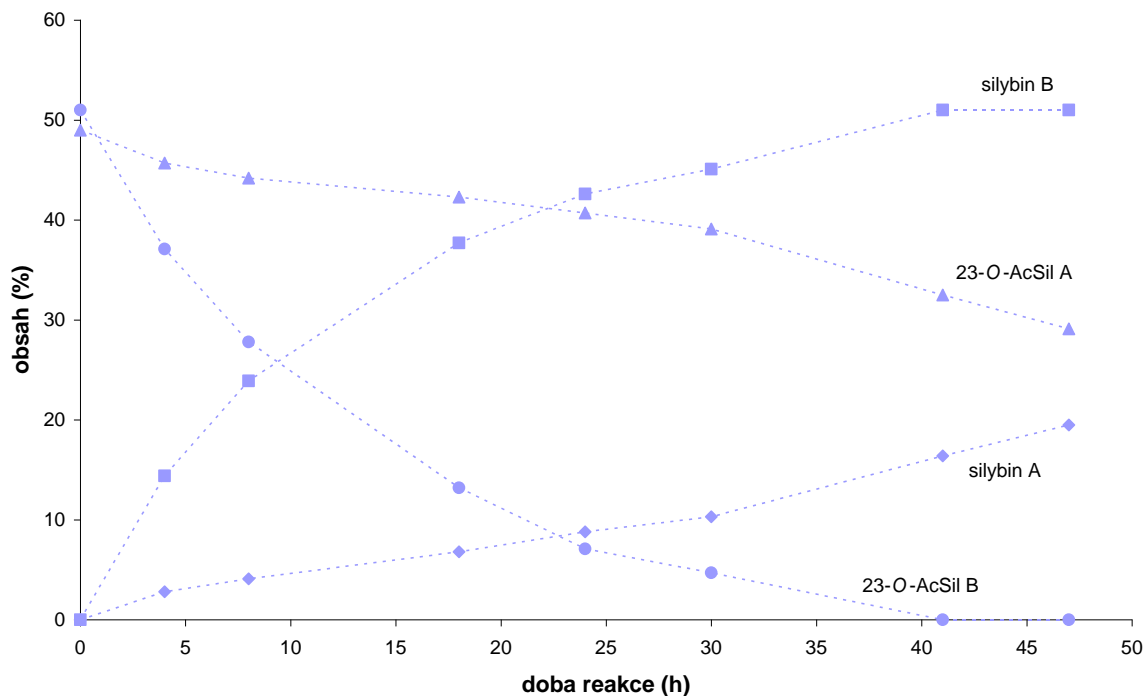
5.2.2 Kinetika hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 v TBME

Sledování závislosti reakčního času na průběh hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu při použití 15 % (w) Novozymu 435 ve směsi TBME/n-butanol (9:1) slouží k optimalizaci reakční doby, kdy bude produkován 23-*O*-acetyl-silybin A v co nejvyšší diastereoisomerní

čistotě. Na *obrázcích 9 a 10* je znázorněn obsah reaktantů a produktů v reakční směsi v závislosti na reakčním čase při teplotě 35 °C a 45 °C.



Obr. 9: Kinetika hydrolýzy 23-O-acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 v TBME při 35 °C



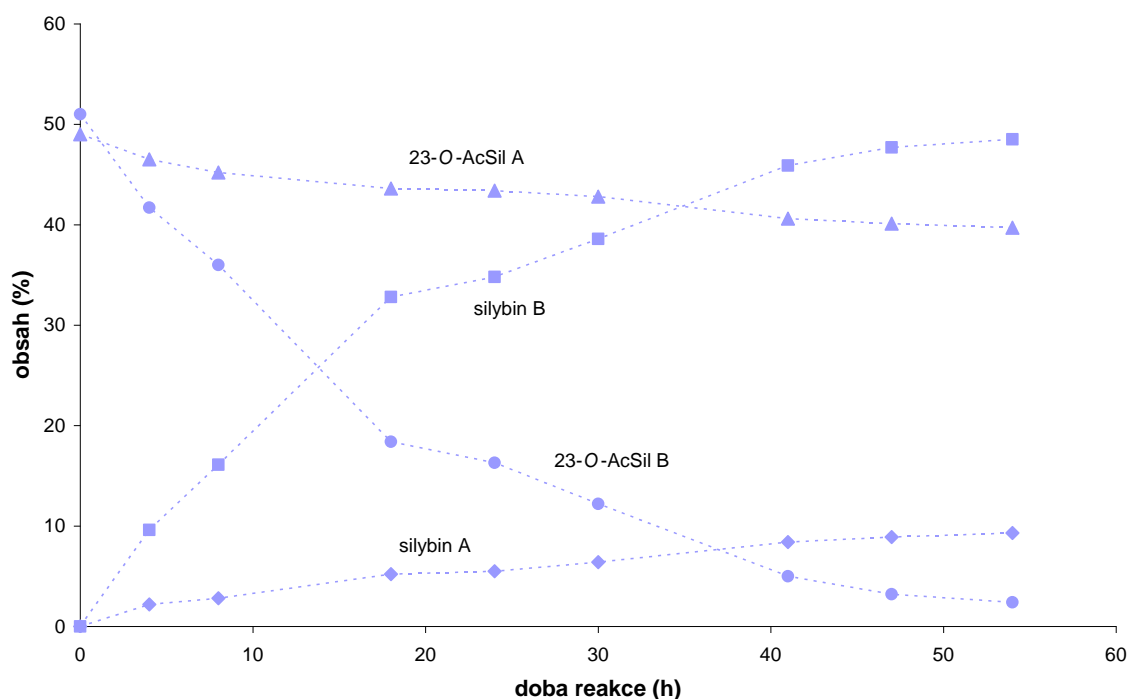
Obr. 10: Kinetika hydrolýzy 23-O-acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 v TBME při 45 °C

Jak je patrné z grafu na *obrázku 10* (str. 53), při teplotě 45 °C lze získat 23-*O*-acetyl-silybin A o vysoké čistotě (d.e. > 97 %) ve výtěžku asi 37 % po 41 h reakce. Jako vedlejší produkt je za těchto podmínek získán obohacený silybin B (d.e. 44 %) ve výtěžku 65 %.

Snížení teploty reakce ze 45 °C na 35 °C nevede k prakticky žádnému zvýšení diastereoselektivity hydrolýzy a jejím jediným efektem je pouze zpomalení reakce (reakce probíhá zhruba dvakrát pomaleji). Vzhledem k omezení tvorby degradačních produktů, vznikajících ze silybinu dlouhodobým kontaktem s rozpouštědly, je tedy teplota 45 °C pro uvedenou reakci vhodnější.

5.2.3 Kinetika hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 v toluenu

Závislost reakčního času na diastereoselektivitou hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu, kdy bylo použito 30 % (w) Novozymu 435 a reakce probíhala ve směsi toluen/*n*-butanol (9:1) při 45 °C je znázorněna na *obr. 11*. Stanovení slouží k optimalizaci reakční doby, kdy bude produkován silybin B v co nejvyšší diastereoisomerní čistotě a zároveň v co nejvyšším výtěžku.



Obr. 11: Kinetika hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 v toluenu při 45 °C

Po 47 h reakci lze získat silybin B (d.e. 84 %) ve výtěžku asi 47 %. K získání čistého silybinu B (d.e. > 95 %) je nutné celou proceduru opakovat. Diastereoisomerně obohacený silybin B je nejprve enzymově esterifikován na 23-*O*-acetyl-silybin a ten opět podroben enzymové hydrolýze za obdobných podmínek, tedy s použitím 30 % (w) Novozymu 435 ve směsi toluen/*n*-butanol při 45 °C. Pouze reakční doba je v tomto případě delší - 60 h.

5.2.4 Příprava opticky čistého silybinu A a B v preparativním měřítku

Schéma 6 znázorňuje preparativní přípravu opticky čistých diastereoisomerů silybinu. Z 30 g směsného silybinu bylo optimalizovanými metodami získáno 6,28 g silybinu A (95 % d.e.) a 10 g čistého silybinu B (95 % d.e.), kde teoretický výtěžek silybinu A (**1a**) je 42 % a silybinu B (**1b**) 67 %. Podstata této optimalizované metody spočívá ve využití diastereoisomerně obohaceného **1b**, který je získán po první hydrolytické reakci 23-*O*-acetyl-silybinu (**12**), jež slouží k získání opticky čistého 23-*O*-acetyl-silybinu A. Takto získaný diastereoisomerně obohacený **1b** je již vhodným výchozím materiálem pro získání opticky čistého **1b**. Výhodou tohoto postupu je snížení spotřeby enzymu (na vstupní množství substrátu je použito 15 % (w) enzymu) a získání opticky čistého stereoisomeru již po první hydrolýze. Další výhodou je podstatné zvýšení výtěžku **1b** (téměř dvojnásobné) oproti postupu, kdy je vstupní **12** (směs **12a** a **12b**, 1:1) podroben opakované hydrolýze ve směsi toluen/*n*-butanol. U reakcí v preparativním měřítku lze navíc využít krystalizaci (ze směsi MeOH/H₂O), pomocí níž lze zvýšit čistotu finálních produktů z asi 95 % d.e. až na více než 97 % d.e.

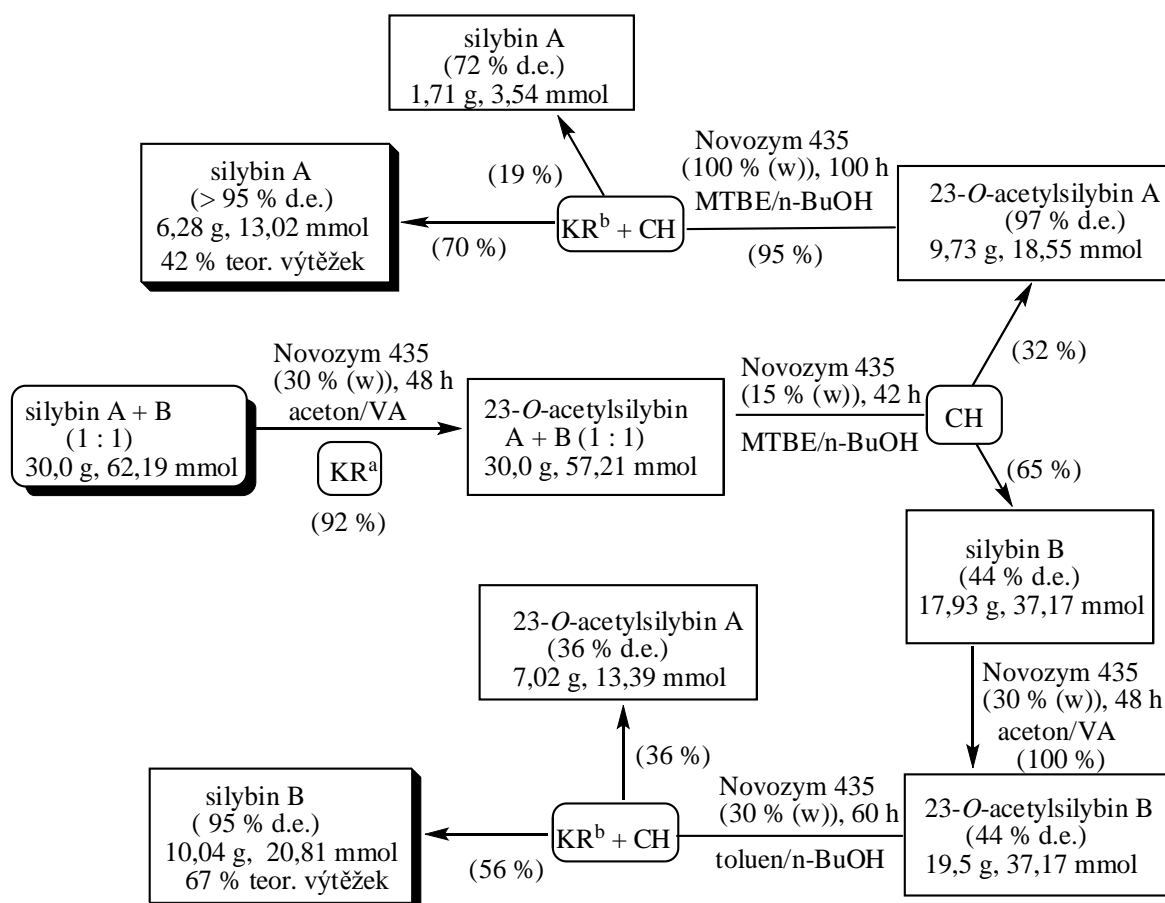


Schéma 6: Příprava opticky čistých silybinů v preparativním měřítku

CH - preparativní sloupcová chromatografie na silikagelu ($\text{CHCl}_3/\text{aceton}/\text{HCOOH}$, 90:10:1), KR^a - krystalizace z MeOH, KR^b - krystalizace z MeOH/ H_2O

5.2.5 Kovalentní modifikace Novozymu 435

V rámci této části práce byly připraveny tři typově odlišné preparáty kovalentně modifikovaného Novozymu 435 (acetylovaný, sukcinylovaný a hydroxylethylamidovaný Novozym 435) a následně byl porovnáván vliv těchto chemických modifikací na stereoselektivitu a konverzi hydrolýzy 23-O-acetyl-silybinu ve srovnání s nemodifikovaným Novozymem 435. Tyto parametry byly sledovány opět ve dvou směsích rozpouštědel, TBME/n-butanol (*tab. 12, str. 57*) a toluen/n-butanol (*tab. 13, str. 57*), aby bylo možno posoudit vliv „kosolventu“ na průběh reakcí u jednotlivých kovalentních modifikací enzymu. V první fázi byl sledován průběh reakcí pomocí TLC, paralelní experimenty byly ukončeny v okamžiku, kdy bylo dosaženo přibližně 50 %-ní

konverze pro nemodifikovaný Novozym 435 (po 65 h). Pouze v případě hydroxyethylamidovaného enzymu byla reakce ukončena po delší době (72 h), neboť konverze byla podle TLC u této reakce po 65 h velice nízká. Jednotlivé reakční směsi byly po zpracování analyzovány pomocí HPLC.

Tab. 12: Diastereoselektivita a konverze hydrolýzy 23-O-acetyl-silybinu ve směsi TBME/n-butanol (20 % (w) enzymu, 45 °C, 65 h)

složka	Novozym 435	Sukcinylovaný Novozym 435	Hydroxyethylamidovaný Novozym 435*	Acetylovaný Novozym 435
ee Silybin B	0,70	0,70	0,62	0,41
ee substrát	0,57	0,24	0,02	0,88
konverze	50,84	27,11	8,49	71,05
E	10,1	7,2	4,3	6,3

* - vzhledem k velice nízké aktivitě preparátu byla reakce analyzována až po 72 h

Tab. 13: Diastereoselektivita a konverze hydrolýzy 23-O-acetyl-silybinu ve směsi toluen/n-butanol (20 % (w) enzymu, 45 °C, 65 h)

složka	Novozym 435	Sukcinylovaný Novozym 435	Hydroxyethylamidovaný Novozym 435*	Acetylovaný Novozym 435
ee Silybin B	0,73	0,69	0,65	0,22
ee substrát	0,24	0,11	0,02	0,52
konverze	26,69	20,73	10,16	14,94
E	8,2	6,1	4,9	2,4

* - vzhledem k velice nízké aktivitě preparátu byla reakce analyzována až po 72 h

Modifikace Novozymu 435 sukcinylací či hydroxyethylamidací vedou v obou soustavách rozpouštědel k výraznému snížení konverze, ale také ke zhoršení diastereoselektivity. Nejvýrazněji se oba negativní efekty projevují u hydroxyethylamidovaného preparátu. Vliv acetylce enzymu na průběh hydrolýzy je do značné míry závislý na použité směsi rozpouštědel. V soustavě TBME/n-butanol je v porovnání s nemodifikovaným enzymem mírně snížena diastereoselektivita reakce, zvyšuje se však aktivita enzymu (za stejných podmínek je dosaženo vyšší konverze substrátu). V soustavě toluen/n-butanol je naproti tomu jak konverze, tak také diastereoselektivita acetylovaného enzymu výrazně horší než u nemodifikovaného enzymu. Diastereoselektivita je v tomto případě dokonce nejnižší ze všech tří provedených modifikací.

Vzhledem k tomu, že konverze u acetylovaného a nemodifikovaného enzymu v soustavě TBME/n-butanol přesáhla 50 %, bylo pro přesnější určení diastereoselektivity acetylovaného enzymu potřeba tuto reakci opakovat. Pro lepší vyhodnocení vlastností acetylovaného (*tab. 14*) a nemodifikovaného enzymu (*tab. 15*) byla stanovena kinetika hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu pro oba enzymy ve směsi TBME/n-butanol při 45 °C s 20 % (w/w) enzymu.

Tab. 14: Diastereoselektivita acetylovaného Novozymu 435

čas (h)	0	8	24	30	49
složka	obsah [%]	obsah [%]	obsah [%]	obsah [%]	obsah [%]
Silybin A	0	2,1	4,1	4,9	7,2
Silybin B	0	12,4	28,3	32,1	41,0
23- <i>O</i> -Acetylsilybin A	50	47,9	45,9	45,0	43,2
23- <i>O</i> -Acetylsilybin B	50	37,6	21,7	18,0	8,6
d.e. substrát	-	12	36	43	67
d.e. produkt	-	71	75	74	70

Tab. 15: Diastereoselektivita nemodifikovaného Novozymu 435

čas (h)	0	8	24	30	49
složka	obsah [%]	obsah [%]	obsah [%]	obsah [%]	obsah [%]
Silybin A	0	2,1	4,3	5,2	7,7
Silybin B	0	12,3	29,2	33,6	42,2
23- <i>O</i> -Acetylsilybin A	50	47,9	45,8	45,3	42,9
23- <i>O</i> -Acetylsilybin B	50	37,7	20,6	15,9	7,2
d.e. substrát	-	12	38	48	71
d.e. produkt	-	71	75	73	69

Měření reakčních kinetik obou enzymů neprokázalo výraznější rozdíly ani v konverzi ani v diastereoselektivitě reakcí katalyzovaných acetylovaným preparátem Novozymu 435 a nemodifikovaným enzymem. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že ani acetylace Novozymu 435 nevedla k očekávanému zlepšení jeho katalytických vlastností.

5.2.6 Využití 3,5,7,20,23-penta-*O*-acetyl-silybinu jako substrátu pro určení regioselektivity lipas

V další části práce byl proveden test několika lipas, jejichž seznam je uveden v *tabulce 4* (str. 36). Lipasy poskytující produkt(y) při hydrolýze 3,5,7,20,23-penta-*O*-acetyl-silybinu (**17**) jako substrátu, ve dvou různých směsích rozpouštědel, tj. v TBME/n-butanol a toluen/n-butanol, jsou uvedeny v *tabulce 16*.

V soustavě rozpouštědel TBME/n-butanol je reakce daleko rychlejší (48 h) v porovnání se soustavou toluen/n-butanol (150 h) a také konverze reakcí jsou daleko vyšší při použití TBME jako „kosolventu“.

Tab. 16: Hydrolýza 3,5,7,20,23-penta-*O*-acetyl-silybinu v TBME a toluenu při použití různých lipas

Enzym	Hydrolýza v TBME	Izolovaný produkt	Hydrolýza v toluenu	Izolovaný produkt
	48 h		150 h	
lipasa AK	●	18, 19	●	18, 19
lipasa PS	●	19	●	18, 19
lipasa M			●	
lipasa N			●	
lipasa R			●	
lipasa A	●			
lipasa z <i>Candida rugosa</i>	●	KPP4(*)	●	
Novozym 435	●		●	
CAL-A			●	
CAL-B	●			
subtilisin	●		●	18, 19
acylasa Amano 3000	●		●	18, 19

● - pozitivní reakce (tj. reakce poskytující produkt, popř. separovatelnou směs produktů)

(*) - Produkt KPP4 byl získán reakcí pouze s jedinou „šarží“ lipasy z *C. rugosa*. Vzhledem k tomu, že pro preparativní reakci bylo nutno použít větší množství enzymu, byla použita nová „šarže“ zmíněné lipasy, tato však již nebyla schopna hydrolyzovat substrát.

Všechny lipasy uvedené v *tabulce 16* (str. 59) poskytují shodné majoritní produkty **18** a **19**, jak bylo zjištěno na základě retenčních časů u HPLC. Nejlepší výtěžky obou produktů poskytovala za uvedených podmínek lipasa AK (*schéma 7*), která byla použita pro jejich preparativní přípravu. Připravené produkty byly izolovány a charakterizovány pomocí NMR.

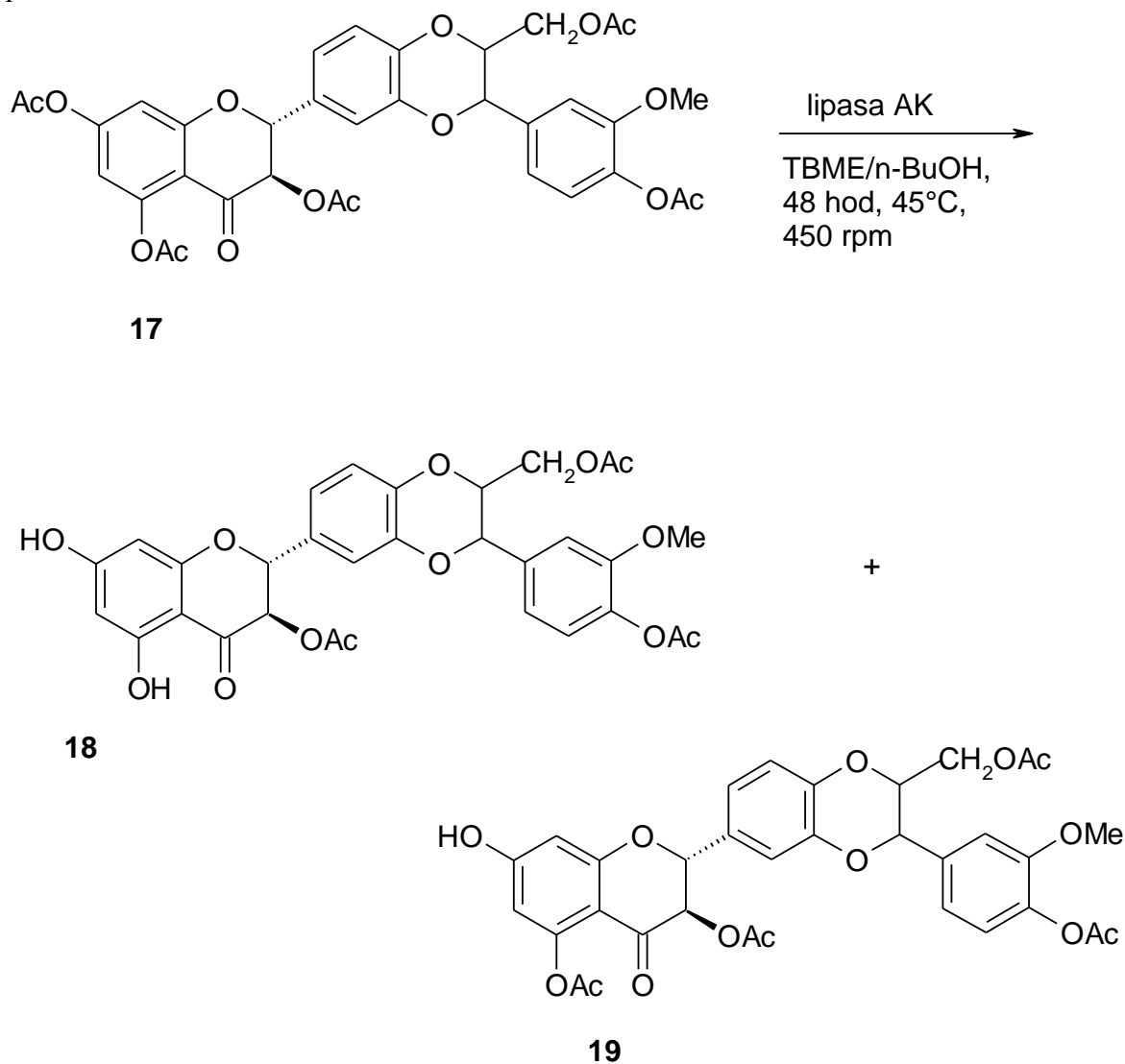


Schéma 7: Reakce 3,5,7,20,23-penta-*O*-acetyl-silybinu (**17**) s lipasou AK vedoucí k produktům **18** a **19**.

6 DISKUZE

VÝZNAM ČISTÝCH DIASTEREOMERŮ SILYBINU A DOSTUPNÉ METODY JEJICH SEPARACE

Přírodní silybin je tvořen směsí dvou diastereoisomerů - silybinu A a B. Je dobře známou skutečností, že biologické účinky jednotlivých enantiomerů racemické směsi jsou rozdílné. Konkrétní biologickou aktivitu vykazuje často pouze jeden z enantiomerů, druhý je buď zcela neaktivní nebo může mít dokonce aktivitu nežádoucí. Racemická směs pak má v lepším případě nižší aktivitu než čistý aktivní enantiomer, může však mít aktivitu zcela odlišnou od aktivit čistých isomerů. Toto platí ještě výrazněji pro stereoisomery tvořící diastereoisomerní směs. Navzdory tomu však většina publikovaných prací zabývajících se studiem biologických vlastností silybinu či jeho chemickými modifikacemi byla vždy prováděna se směsným silybinem, protože opticky čisté isomery jsou k dispozici pouze v malém množství - desítky miligramů. Silybin A a B jsou dostupnými metodami v preparativním měřítku nedělitelné, jejich separace lze dosáhnout pouze pomocí semipreparativní nebo preparativní HPLC,^[47,48] jež je však pro separaci v preparativním měřítku zcela nevhodná (poměrně nákladná, časově náročná a nízkokapacitní metoda).

Kromě HPLC existuje ještě další, již skutečně preparativní metoda pro dělení diastereoisomerů silybinu ve formě jeho galaktosidů.^[19,49] Tato metoda má řadu výhod oproti preparativní HPLC, je však vhodná pouze pro přípravu menšího množství jednotlivých silybinů (stovek mg až jednotek g), neboť chromatografická separace diastereoisomerní směsi glykosidů silybinu je poměrně kritická a její účinnost není vysoká. Pro získání velmi čistého isomeru (d.e. > 95 %) je nutné separaci několikrát opakovat, což dále snižuje výtěžek této metody. Jestliže chceme získat opticky čistý silybin A nebo B, je nutné hydrolyzovat získaný glykosid silybinu, což je opět spojeno s určitými ztrátami.

VYUŽITÍ GLYKOSIDAS K CHIRÁLNÍ DISKRIMINACI ISOMERŮ SILYBINU

Samotná příprava diastereoisomerní směsi galaktosidů silybinu je poměrně snadná a poskytuje velice dobré výtěžky (kolem 90 %).^[19] Nalezení vhodné glykosidasy, která by byla schopna chirálně rozlišit oba glykosidy silybinu a selektivně hydrolyzovat pouze jeden z nich, by významně přispělo k vylepšení předchozí metody. Značně by se tak zjednodušila separace diastereoisomerní směsi, neboť by se v tomto případě separovala směs glykosidu jednoho z diastereoisomerů silybinu a volného (tedy aglykonu) druhého

diastereoisomeru. Veškeré pokusy o chirální separaci 23-*O*- β -D-galaktopyranosyl-silybinu (**13**) pomocí β -D-galaktosidasy však selhaly díky nízké diastereoselektivitě enzymu ($E = 1,0 - 1,5$). Tento výsledek nebyl příliš překvapivý, neboť glykosidasy nepatří k enzymům, které by byly často využívány pro chirální separace racemických, popř. diastereoisomerních směsí. Vyšší stereoselektivity lze dosáhnout pouze při transglykosylačních reakcích racemických směsí poměrně jednoduchých chirálních alkoholů.^[19,49] Na základě těchto skutečností se v použití glykosylas pro účely chirálních separací dále nepokračovalo.

VYUŽITÍ LIPAS K CHIRÁLNÍ SEPARACI ISOMERŮ SILYBINU

Ve spolupráci naší laboratoře s laboratoří Chemie molekulárního rozpoznávání (C.N.R., Miláno) byla testována schopnost hydrolas (lipas, proteas, acylas) chirálně rozlišit oba isomery pomocí transesterifikační reakce směšného silybinu a při hydrolýze 23-*O*-acetyl-silybinu. Na základě „screeningu“ byl vybrán jediný vhodný enzym – Novozym 435 (lipasa B z *C. antarctica* imobilizovaná na polyakrylamidové pryskyřici), pro nějž byla v rámci této diplomové práce provedena optimalizace podmínek jeho použití s cílem vyvinout metodu preparativní přípravy obou opticky čistých diastereoisomerů silybinu.

Z výsledků získaných v rámci zmíněné spolupráce vyplynulo, že diastereoselektivita Novozymu 435 při transesterifikační reakci je poměrně nízká ($E = 2,6$) a lze ji tedy použít pouze k získání diastereoisomerně obohacené směsi silybinů. Další optimalizace byla proto zaměřena na reakci opačnou, enzymovou hydrolýzu směšného 23-*O*-acetyl-silybinu (směsi diastereoisomerů A a B v poměru cca 1:1). Diastereoselektivita této hydrolytické reakce je ve srovnání s transesterifikací silybinu podstatně vyšší, již v předběžných testech bylo pro Novozym 435 dosaženo hodnoty $E > 6$, vhodnou volbou rozpouštědla (toluen) byla tato hodnota zvýšena až na 7,7. Ani tato hodnota diastereoselektivity není postačující k získání obou diastereoisomerů v dostatečné optické čistotě (d.e. > 95 %). Cílem této práce bylo optimalizovat reakční podmínky hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu pomocí Novozymu 435 tak, aby bylo možno získat oba diastereoisomery silybinu ve vysokém výtěžku o nejvyšší možné optické čistotě (d.e. ≥ 95 %).

Příprava substrátu pro enzymovou hydrolýzu v preparativním měřítku

Před optimalizací hydrolytické reakce bylo nutné připravit vlastní substrát této reakce - 23-*O*-acetyl-silybin (**12**) (tvořený oběma diastereoisomery v poměru 1:1). Původní publikovaná metoda, založená na regioselektivní acetylaci silybinu acetanhydridem v přítomnosti $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, poskytuje pouze průměrné výtěžky **12** (kolem 60 %) a získanou reakční směs je nutno purifikovat pomocí chromatografie na silikagelu. Výtěžek této reakce se podařilo zvýšit optimalizací reakčních podmínek, kdy se jako zdroj acylu použil místo acetanhydridu ethyl-acetát, který zde zároveň sloužil jako rozpouštědlo. Reakce byla katalyzována $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ a výtěžek esteru **12** byl 90 %, nicméně jeho HPLC analýza odhalila vznik dalšího stereoisomeru této látky, který byl později identifikován jako *cis*-(10,11)-23-*O*-acetyl-silybin. *Cis*-isomer **12** je prakticky neseparovatelný od *trans*-isomeru, což tuto esterifikační metodu činí nepoužitelnou pro přípravu substrátu **12**. Při hledání alternativní metody pro přípravu substrátu **12** bylo zjištěno, že transesterifikační reakce silybinu na ester **12**, katalyzovaná Novozymem 435, je sice poměrně málo diastereoselektivní, ale probíhá s velice dobrou konverzí a mohla by tak sloužit k přípravě substrátu **12**. Optimalizací reakčních podmínek se podařilo vyvinout vysoce efektivní enzymovou metodu přípravy substrátu **12**, s více než 90 %-ním výtěžkem této látky. Vysoká čistota vzniklého produktu navíc umožňovala jeho finální dočištění krystalizací, což je zvláště ve větším měřítku obrovskou výhodou oproti chromatografické purifikaci. Spotřeba enzymu při této reakci není vysoká (postačuje 30 % (w/w) enzymu vůči substrátu), enzym je navíc možno použít opakovaně bez výrazné ztráty aktivity (bylo testováno až pětinasobné opakované použití enzymu), přičemž mírné snížení aktivity enzymu je možno kompenzovat použitím vyššího poměru enzym (použitý)/substrát.

Sledování vlivu rozpouštědla na průběh hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu

Diastereoselektivita hydrolýzy esteru **12** katalyzovaná Novozymem 435 je poměrně výrazně ovlivněna volbou použité soustavy rozpouštědel. To dokládají experimenty s různými „kosolventy“, které byly přidány k vlastnímu akceptoru acylu – *n*-butanolu. Přítomnost *n*-butanolu, který je přidáván do reakční směsi v mnohonásobném přebytku vůči substrátu, je nezbytná pro dosažení ireverzibilního průběhu hydrolýzy, neboť dochází k posouvání rovnováhy reakce ve prospěch vzniku silybinu. Úlohou „kosolventu“ je pak vhodně modulovat katalytické vlastnosti enzymu, popř. napomáhat stabilizaci intermediátů enzymové reakce. Z předběžných výsledků, jež byly k dispozici, vyplývalo, že nejlepší

diastereoselektivity hydrolýzy substrátu **12** je dosaženo při použití toluenu ($E = 7,7$), *tert*-amyl alkoholu ($E = 7,0$) a TBME ($E = 6,5$). Pro další optimalizaci byly vybrány dvě z těchto rozpouštědel, toluen a TBME. Důvodem pro vyřazení *tert*-amyl alkoholu z další optimalizace byl fakt, že průběh reakce v přítomnosti tohoto rozpouštědla vykazoval prakticky stejný profil jako v případě toluenu, pouze diastereoselektivita byla o něco horší. Naproti tomu TBME, který měl z těchto tří „kosolventů“ nejnižší diastereoselektivitu, se ukázal v dalších experimentech velice výhodný, protože výsledek hydrolýzy byl v jeho přítomnosti výrazně odlišný od reakcí s použitím toluenu a *tert*-amyl alkoholu. Kromě toho vykazoval enzym v tomto rozpouštědle nejvyšší aktivitu.

Optimalizace reakčních podmínek hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu

Diastereoselektivita hydrolýzy **12** pomocí Novozymu 435 není dostatečně vysoká k ukončení reakce při dosažení zhruba 50 %-ní konverze substrátu – takto lze postupovat pouze tehdy, je-li hodnota E velmi vysoká (blíží se 100). Jestliže je E poměrně nízké, je nutno reakci ukončit v úzkém časovém intervalu, kdy je dosaženo optimálního poměru optické čistoty a konverze, popř. výtěžku. V tomto případě je možno získat pouze jeden opticky čistý diastereoisomer, druhý pouze mírně obohacený. Pro získání obou chirálně čistých stereoisomerů je nutno pro ten, jež byl získán pouze jako obohacený, celou reakční sekvenci opakovat až po dosažení požadované optické čistoty. Následujícím krokem této práce bylo tedy určit, jak se mění složení reakční směsi v čase při použití konstantního množství enzymu vůči substrátu. Dále bylo zjišťováno, jaký vliv má na tento průběh (kinetiku) reakce použitá reakční teplota, soustava rozpouštědel, a zda je při použití dané konkrétní soustavy rozpouštědel důležitý také poměr „kosolventu“ vůči akceptoru acylu (*n*-butanolu).

Pro sledování jednotlivých parametrů na kinetiku reakce bylo nejprve nutné si zvolit vhodný poměr enzymu vůči substrátu. Tento parametr by se již v dalších experimentech neměl měnit. Volba tohoto poměru však nemůže být náhodná, protože daný poměr do značné míry ovlivňuje rychlost hydrolýzy a má vliv na diastereoselektivitu reakce. Bude-li rychlost příliš vysoká (vyšší poměr enz./substrát), nebude snadné zachytit časový interval, kdy bude čistota jednoho z diastereoisomerů optimální, a kdy bude zároveň dosaženo jeho maximálního výtěžku. Bude-li tento poměr naopak příliš nízký, reakce bude probíhat pomalu a hrozí, že požadovaného optima čistota/výtěžek nebude v reálném čase dosaženo vůbec. Pomalý průběh reakce přináší ještě jednu komplikaci, jíž

je vznik nežádoucích degradačních produktů (2,3-dehydroderivátů silybinu a jeho acetátu a dále polymerizačních produktů), jejichž tvorba se zvyšuje delším kontaktem substrátu/produktu s roztokem. Na základě experimentů provedených v obou soustavách rozpouštědel za konstantní teploty (45 °C) po dobu 40, resp. 45 h s různými poměry enzymu/substrátu bylo zjištěno, že optimální množství enzymu pro soustavu TBME/n-butanol (9:1, v/v) je 15 % (w) (enz./substrát) a pro soustavu toluen/n-butanol (9:1, v/v) je to 30 % (w) (enz./substrát). Získané poměry enzymu vůči substrátu pak byly používány u odpovídajících soustav rozpouštědel beze změny pro další experimenty.

Dalším krokem optimalizace metody bylo stanovení kinetiky reakce, tedy složení reakční směsi v závislosti na čase, přičemž byla použita konstantní teplota reakce (45 °C) a zjištěná optimální množství enzymu. Na základě získaných závislostí lze konstatovat, že reakce s použitím TBME je výrazně rychlejší než při použití toluenu, přestože je v prvním případě použito poloviční množství enzymu. Lze tedy říci, že aktivita Novozymu 435 je závislá na polaritě použitého „kosolventu“ a je vyšší při použití dipolárního aprotického rozpouštědla (TBME) než v případě nepolárního rozpouštědla (toluenu). Patrný je také rozdílný průběh reakcí v jednotlivých soustavách rozpouštědel: nižší diastereoselektivita enzymu v soustavě obsahující TBME vede k mírně obohacenému silybinu B (d.e. = 44 %) a poměrně velmi opticky čistému 23-*O*-acetyl-silybinu A (**12a**) (d.e. = 96 %). Tento výsledek je však dosažen výrazně za hranicí 50 % konverze substrátu **12**, kdy výtěžek **12a** je kolem 30 %. Naproti tomu hydrolýza esteru **12** ve směsi toluen/n-butanol probíhá mnohem selektivněji ve prospěch silybinu B, není však postačující pro získání ani jediného z diastereoisomerů silybinu v požadované optické čistotě (d.e. pro **1b** = 84 %; požadováno je ≥ 95 %). Pro získání opticky čistého silybinu B je tedy nutno celou reakční sekvenci, tj. enzymovou acetylaci obohaceného **1b** a hydrolýzu **12b** ve směsi toluen/n-butanol, ještě jednou opakovat, což je však spojeno s poměrně nízkým výtěžkem **1b** (15,5 %).

V rámci optimalizace metod byl dále sledován také vliv teploty na diastereoselektivitu reakce, kdy byla sledována kinetika hydrolýzy substrátu **12** v obou soustavách rozpouštědel při teplotě 35 °C. Snížení reakční teploty však vedlo pouze ke zpomalení reakce (2× nižší rychlost než při 45 °C), diastereoselektivita hydrolýzy zůstala prakticky stejná. Vliv různých poměrů „kosolventu“ vůči n-butanolu nebyl ověřen přímo, přesto lze konstatovat, že na diastereoselektivitu ani průběh reakce nemá příliš velký vliv. Při sledování kinetiky reakcí byly totiž reakce prováděny v několika paralelních experimentech, kdy u reakčních aparatur docházelo vlivem netěsností k mírnému odpaření

těkavější složky směsi rozpouštědel („kosolventu“). Toto odpaření nebylo rovnoměrné, takže porovnáním složení reakčních směsí u paralelních experimentů bylo možno určit, zda se průběh těchto reakcí liší. Významný rozdíl zde nebyl zaznamenán, rozdíly ve složení směsí u paralelních experimentů byly v řádu desetin až jednotek procent, a to i v případech, kdy se množství rozpouštědel snížilo téměř na polovinu. Zmíněnému odpařování rozpouštědel nebylo možno v analytickém měřítku reakcí zabránit, v preparativním měřítku byl tento problém vyřešen použitím skleněných aparatur s teflonovými zátkami.

Preparativní metoda přípravy opticky čistých isomerů silybinu

Reakcí v soustavě obsahující TBME je získán obohacený silybin B (**1b**) a čistý 23-*O*-acetyl-silybin A (**12a**), v soustavě obsahující toluen je obohacený **1b** převeden na již opticky čistý silybin B, kombinací obou postupů lze dosáhnout dostatečné optické čistoty obou diastereoisomerů silybinu. Na této úvaze byla založena optimalizovaná preparativní metoda jejich přípravy. Výchozí substrát **12** (směs **12a** a **12b**, 1:1) byl nejprve hydrolyzován Novozymem 435 (15 % (w)) ve směsi rozpouštědel TBME/*n*-butanol (9:1, v/v) při 45 °C, přičemž byl získán 23-*O*-acetyl-silybin A (**12a**) (d.e. = 96 %, 32 % výtěžek) a obohacený silybin B (**1b**) (d.e. = 44 %, 65 % výtěžek). Takto získaný silybin B byl acetylován stejným enzymem (Novozymem 435) v prakticky kvantitativním výtěžku na odpovídající 23-*O*-acetyl-silybin B (**12b**, d.e. = 44 %) a následně podroben hydrolýze Novozymem 435 v soustavě toluen/*n*-butanol (při 45 °C). Po této hydrolýze byl získán silybin B o čistotě d.e. = 96 % v celkovém výtěžku 33,5 % (vzhledem k polovičnímu obsahu každého diastereoisomeru ve vstupním acetátu **12** je tak skutečný výtěžek 67 %). Tato preparativní metoda byla nejprve testována v měřítku do asi 4 g vstupního substrátu **12**, následně pak bylo měřítko zvyšováno až na konečných 30 g vstupního acetátu **12**, přičemž jak diastereoselektivita, tak také výtěžky jednotlivých reakčních kroků zůstaly prakticky nezměněny.

Jak již bylo zmíněno, silybin A (**1a**) je za použití této metody získán ve formě svého acetátu **12a**, pro získání volného **1a** je tedy nutno provést vhodnou deacetylaci **12a**. Tato zdánlivě triviální reakce má však svá úskalí – bazicky katalyzovaná deacetylace vede ke vzniku 2,3-dehydrosilybinu a dalších nežádoucích vedlejších produktů, které výrazně snižují čistotu získaného **1a**. Transesterifikační reakci (Zemplénova deacetylace) za použití katalytického množství methanolátu sodného v suchém methanolu opět využít nelze, neboť

kyselé fenolické skupiny přechází vlivem methanolátu na fenoláty, které již zmíněnou reakci nekatalyzují, přebytek methanolátu pak působí stejné nežádoucí reakce, jako již zmíněná bazická hydrolýza. Další možností je kyselá hydrolýza, ta však vedla k částečné isomerizaci silybinu A na *cis*-silybin A, a tak opět snižovala čistotu výsledného silybinu A. Teprve použití přebytku Novozymu 435 (75 – 100% (w) enz./substrát) ve směsi TBME/*n*-butanol vedlo k požadované hydrolýze, aniž by při ní docházelo k výraznému vzniku nežádoucích produktů.

CHEMICKÉ (KOVALENTNÍ) MODIFIKACE NOVOZYMU 435

Modifikace reakčních podmínek není jedinou možností, jak zvýšit diastereoselektivitu nebo aktivitu enzymu. Další možností, která byla již několikrát úspěšně využita,^[78,80] je chemická (kovalentní) modifikace samotného enzymu. Ta je v případě Novozymu 435 o to snazší, že se jedná o imobilizovaný enzym a purifikace připraveného preparátu tak spočívá v pouhém odstranění enzymu z reakční směsi filtrací a jeho případným promytí vodou popř. vhodným pufrům. Vlastní modifikace enzymu je založena na reakci aminokyselinových zbytků na povrchu enzymu s vhodným činidlem. Nejčastěji modifikovanými skupinami jsou karboxylové skupiny, volné aminoskupiny, thiolové a hydroxylové skupiny. Pro modifikaci Novozymu 435 byly využity tři popsané modifikace^[78] – acetylace, sukcinylace a hydroxyethylamidace. Z povahy uvedených skupin je zřejmé, že každá z těchto modifikací povede k jinému typu preparátu: acetylace aminoskupin zvýší lipofilitu povrchu enzymu, sukcinylace aminoskupin změni povrchový náboj enzymu (kladný náboj protonizované aminoskupiny je nahrazen záporným nábojem karboxylátového iontu) a hydroxyethylamidace povede ke ztrátě záporného náboje povrchových karboxylových skupin, aniž by byla výrazně zvýšena lipofilita povrchu enzymu (karboxylová skupina bude formálně zaměněna za volnou hydroxylovou skupinu).

Vliv jednotlivých modifikací na průběh hydrolýzy 23-*O*-acetyl-silybinu byl následně porovnán s nemodifikovaným Novozymem 435 za zcela analogických podmínek, jaké byly použity v předchozí části práce, tedy při teplotě 45 °C v obou soustavách rozpouštědel a s obdobnými poměry enzymu vůči substrátu.

Bylo zjištěno, že všechny použité modifikace Novozymu 435 vedou v obou soustavách rozpouštědel ke zhoršení diastereoselektivity reakce. Ve většině případů došlo také k výraznému zhoršení konverze substrátu. Nejvýrazněji se tyto negativní efekty projevíly u hydroxyethylamidovaného preparátu. Sukcinylace zhoršovala

diastereoselektivitu enzymu poměrně málo, ale výrazně snižovala aktivitu enzymu. U acetylovaného preparátu byla pozorována zvýšená aktivita tohoto enzymu oproti nemodifikovanému Novozymu 435, tento efekt se však projevil pouze v soustavě TBME/n-butanol. Naopak, aktivita i diastereoselektivita acetylovaného preparátu se výrazně zhoršila v soustavě toluen/n-butanol, v níž se tato modifikace jevila jako nejhorší (téměř úplná ztráta diastereoselektivity spojená s výrazným poklesem aktivity enzymu). Výrazná závislost acetylovaného enzymu na použitém „kosolventu“ je pravděpodobně způsobena charakterem této modifikace, jež vede ke zvýšení lipofility enzymu. Překvapivé je však to, že vliv této modifikace nekoreluje s polaritou použitých rozpouštědel, ale je právě opačný – lipofilnější enzym je aktivnější v polárnějším TBME než v nepolárním toluenu. Acetylovaný enzym však stále obsahuje na povrchu volné karboxylové skupiny, je tedy možné, že právě ony jsou lépe stabilizovány v přítomnosti TBME vlivem možné tvorby vodíkových vazeb. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že provedené modifikace Novozymu 435 nevedly k očekávanému zlepšení jeho katalytických vlastností. To sice nevylučuje, že v budoucnu může být nalezena vhodná modifikace, která by byla v tomto směru úspěšná, ale vzhledem k časové náročnosti těchto experimentů nebyly již další modifikace Novozymu 435 v rámci této práce testovány.

OVĚŘENÍ REGIOSELEKTIVITY LIPAS PRO HYDROLÝZU PERACETYLOVANÉHO SILYBINU

Poslední částí této diplomové práce, která s předchozími celky nepřímo souvisí, bylo zjištění regioselektivity hydrolýzy peracetylovaného silybinu pomocí stejné série lipas, použitých pro studium kinetického rozlišení diastereoisomerů silybinu. Účelem této práce bylo vyvinout alternativní metody k přípravě selektivně chráněných derivátů silybinu, jež jsou prozatím připravovány výhradně chemickou syntézou. Výhodou tohoto přístupu oproti chemické syntéze je jeho jednoduchost a časová nenáročnost. Při chemické syntéze selektivně chráněných derivátů silybinu je totiž nutno použít minimálně dvou vzájemně nezávislých chránících skupin, z nichž je pak nutno jednu odstranit, aby byl získán selektivně chráněný derivát. Vývoj takové chránicí strategie je poměrně náročný a musí mu předcházet podrobná studie reaktivity jednotlivých funkčních skupin modifikované látky. Využití biokatalýzy k tomuto účelu vede k výraznému zjednodušení celého postupu, neboť požadovaný selektivně chráněný derivát je možno obdržet

z kompletně chráněného derivátu vhodnou volbou enzymu, případně jejich kombinací, v jednom až dvou reakčních krocích.

Vlastní práce spočívala v testování jednotlivých lipas na jejich schopnost hydrolyzovat peracetylovaný silybin, přičemž byly použity dvě soustavy rozpouštědel, které se osvědčily již při studiu diastereoselektivity lipas – TBME/n-butanol a toluen/n-butanol. Z testované série 26 lipas jich bylo pouze 12 schopno hydrolyzovat použitý substrát a z nich pouze 4 dosahovaly dostatečné regioselektivity a konverze hydrolýzy, využitelné i pro preparativní reakce. Všechny tyto lipasy však poskytovaly stejnou dvojici majoritních produktů, které se podařilo izolovat a ověřit tak jejich strukturu. Ukázalo se, že tyto lipasy přednostně hydrolyzují polohy 5-OH a 7-OH substrátu a poskytují tak 3,5,20,23-tetra-*O*-acetyl-silybin a 3,20,23-tri-*O*-acetyl-silybin.

Typově do této části práce spadá také vyvinutá metoda přípravy 23-*O*-acetyl-silybinu, použitého jako substrátu pro chirální separaci diastereoisomerů silybinu. Přestože byl v tomto případě použit jako substrát silybin a nikoli jeho peracetát, je tato reakce přesným příkladem úspěšné aplikace lipas pro regioselektivní syntézu selektivně modifikovaného derivátu silybinu.

7 ZÁVĚR

Cíle předkládané diplomové práce byly splněny:

1. V rámci této práce byla nalezena metoda chirální separace diastereoisomerů silybinu. Byl při ní používán Novozym 435 (lipasa CAL B imobilizovaná na polyakrylamidové pryskyřici), který při použití dvou různých systémů rozpouštědel (toluen/n-butanol nebo TBME/n-butanol) poskytuje jednotlivé silybiny. Optimalizovanou metodou bylo možno připravit 6,3 g silybinu A (d.e. > 95 %) ve výtěžku 42 % a 10,0 g silybinu B (d.e. 95 %) ve výtěžku 67 %.
2. Kromě modifikace reakčních podmínek byl testován i vliv chemických (kovalentních) modifikací samotného enzymu na jeho diastereoselektivitu či aktivitu. Byl připraven acetylovaný, sukcinylovaný a hydroxyethylamidovaný Novozym 435. Zmíněné modifikace ale požadované změny nepřinesly, enzym byl jimi spíše inhibován, pouze acetylovaný Novozym 435 měl selektivitu a aktivitu srovnatelnou s nemodifikovaným Novozymem 435.
3. V neposlední řadě byla testována schopnost β -D-galaktosidasy separovat diastereoisomery galaktosidu silybinu. Ta sice připravený substrát hydrolyzovala velmi rychle a s vysokou konverzí, ale bez jakékoliv diastereopreference.
4. V rámci této práce byl také nalezen způsob přípravy selektivně chráněných derivátů silybinu pomocí lipas. Při použití lipasy AK a peracetylovaného silybinu jako substrátu byly získány produkty 3,5,20,23-tetra-*O*-acetyl-silybin a 3,20,23-tri-*O*-acetyl-silybin, které lze použít jako selektivně chráněné deriváty pro další chemické syntézy.

Důležitým úkolem budoucích studií bude připravit nové deriváty silybinu z jeho opticky čistých stereoisomerů získaných v této práci a stanovit jejich biologické aktivity se zaměřením na možnost následného využití ve farmaceutickém průmyslu.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Gažák, R., Walterová, D., Křen, V.: Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. *Curr. Med. Chem.* **14**, 315-338 (2007).
- ² Morazzoni, P., Bombardelli, E.: *Silybum marianum* (*Carduus marianus*). *Fitoterapia* **66**, 3-42 (1995).
- ³ Davis-Searles, P. R., Nakanishi, Y., Kim, N.-Ch., Graf, T.N., Oberlies, N. H., Wani, M. C., Wall, M. E., Agarwal, R., Kroll, D. J.: Milk thistle and prostate cancer: differential effects of pure flavonolignans from *Silybum marianum* on antiproliferative end points in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* **65**, 4448–4457 (2005).
- ⁴ Plíšková, M., Vondráček, M., Křen, V., Gažák, R., Sedmera, P., Walterová, D., Psotová, J., Šimánek, V., Machala, M.: Effects of silymarin flavonolignans and synthetic silybin derivatives on estrogen and aryl hydrocarbon receptor activation. *Toxicology* **215**, 80-89 (2005).
- ⁵ Křen, V., Ulrichová, J., Kosina, P., Stevenson, D., Sedmera, P., Přikrylová, V., Halada, P., Šimánek, V.: Chemoenzymatic preparation of silybine β -glucuronide and their biological evaluation. *Drug Metab. Disp.* **28**, 1513-1517 (2000).
- ⁶ Kim, N. Ch., Graf, T. N., Sparacino, Ch. M., Wani, M. C., Wall, M. E.: Complete isolation and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Org. Biomol. Chem.* **1**, 1684-1689 (2003).
- ⁷ Wagner, H., Hörhammer, L., Münster, R.: Zur chemie des silymarins (Silybin), des wirkprinzips der fruchte von *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Cardus marianus* L.). *Arzneim.-Forsch.* **18**, 688-695 (1968).
- ⁸ Wagner, H., Hörhammer, L., Seitz, M.: Chemical evaluation of a silymarin-containing flavonoid concentrate from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneim.-Forsch.* **18**, 696-698 (1968).
- ⁹ Lee, D. Y.-W., Liu, Y.: Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, and isosilybin B, isolated from *Silybum marianum* (Milk Thistle). *J. Nat. Prod.* **66**, 1171-1174 (2003).
- ¹⁰ Freudenberg, K., Neish, A. C.: Constitution and biosynthesis of lignin, str. 82. Springer Verlag, Berlin (1968).
- ¹¹ Pelter, A., Hänsel, R.: The structure of silybin (silybum substance E₆), the first flavonolignan. *Tetrahedron Lett.* **25**, 2911-2916 (1968).
- ¹² Schrall, R., Becker, H.: Callus- und suspensionskulturen von *Silybum marianum*. *Planta Med.* **32**, 27-32 (1977).
- ¹³ Arnone, A., Merlini, L., Zanarotti, A.: Constituents of *Silybum marianum*. Structure of isosilybin and stereochemistry of silybin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **79**, 696-697 (1979).
- ¹⁴ Tanaka, H., Shibata, M., Ohira, K., Ito, K.: Total synthesis of (+/-)-silybin, an antihepatotoxic flavonolignan. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1419-1423 (1985).
- ¹⁵ Markham, K. R.: Techniques of flavonoid identification, str. 2. Academic Press, New York (1982).
- ¹⁶ Goodwin, T. W., Mercer, E. I.: Introduction to plant biochemistry, str. 81. Pergamon Press, London (1983).
- ¹⁷ Braatz, R., Gurler, K., Bergish, G., Halbach, G., Soicke, H., Schmidt, K.: Czech. Pat., 1985, 273610, (Chem. Abstr., 1985, 105, P127476b).

- ¹⁸ Pifferi, G., Pace, R., Conti, M.: Synthesis and antihepatotoxic activity of silybin 11-O-phosphate. *II Farmaco* **49**, 75-76 (1994).
- ¹⁹ Křen, V., Kubisch, J., Sedmera, P., Halada, P., Přikrylová, V., Jegorov, A., Cvak, L., Gebhardt, R., Ulrichová, J., Šimánek, V.: Glycosylation of silybin. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2467-2474 (1997).
- ²⁰ Gažák, R., Svobodová, A., Psotová, J., Sedmera, P., Přikrylová, V., Walterová, D., Křen, V.: Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 5677-5687 (2004).
- ²¹ Džubák, P., Hajdúch, M., Gažák, R., Svobodová, A., Psotová, J., Walterová, D., Sedmera, P., Křen, V.: New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 3793-3810 (2006).
- ²² Gažák, R., Sedmera, P., Marzorati, M., Riva, S., Křen, V.: Laccase-mediated dimerization of the flavonolignan silybin. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **50**, 87-92 (2008).
- ²³ Gažák, R., Purchartová, K., Marhol, P., Živná, L., Sedmera, P., Valentová, K., Kato, N., Matsumura, H., Kaihatsu, K., Křen, V.: Antioxidant and antiviral activities of silybin fatty acid conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 1059-1067 (2010).
- ²⁴ Theodosiou, E., Katsoura, M. H., Loutrari, H., Purchartová, K., Křen, V., Kolisis, F. N., Stamatis, H.: Enzymatic preparation of acylated derivatives of silybin in organic and ionic liquid media and evaluation of their antitumor proliferative activity. *Biocat. Biotrans.* **27**, 161-169 (2009).
- ²⁵ Wang, F., Huang, K., Yang, L., Gong, J., Tao, Q., Li, H., Zhao, Y., Zeng, S., Wu, X., Stockigt, J., Li, X., Qu, J.: Preparation of C-23 esterified silybin derivatives and evaluation of their lipid peroxidation inhibitory and DNA protective properties. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 6380-6389 (2009).
- ²⁶ Trouillas, P., Marsal, P., Svobodová, A., Vostálová, J., Gažák, R., Hrbáč, J., Sedmera, P., Křen, V., Lazzaroni, R., Duroux, J.-L., Walterová, D.: Mechanism of the antioxidant action of silybin and 2,3-dehydrosilybin flavonolignans: A joint experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. A* **112**, 1054-1063 (2008).
- ²⁷ McPartland, J. M.: Viral hepatitis treated with *Phyllanthus amarus* and milk thistle (*Silybum marianum*): A case report. *Complementary Med. International* **96**, 40-42 (1996).
- ²⁸ Blumenthal, M., Busse, W.: The complete german commission E monographs: Therapeutic to herbal medicines. American botanical council and integrative medicine communications, str. 685-698, Austin, TX (1998).
- ²⁹ Wieland, T.: Struktur und wirkung der amatoxine. *Naturwissenschaften* **59**, 225-231 (1972).
- ³⁰ Wieland, T., Faulstich, H.: Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: The biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *C.R.C. Crit. Rev. Biochem.* **78**, 185-260 (1978).
- ³¹ Vogel, G., Tuchweber, B., Trost, W., Mengs, U.: Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **73**, 355-62 (1984).
- ³² Hahn, G., Lehmann, H. D., Kürten, M., Uebel, H., Vogel, G.: Zur pharmakologie und toxikologie von silymarin, des antihepatotoxischen wirkprinzips aus *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Arzneim.-Forsch.* **18**, 698-704 (1968).
- ³³ Schriewer, H., Badde, R., Roth, G., Raven, H. M.: Antihepatotoxic effect of silymarine in thioacetamide-damaged liver. *Arzneim.-Forsch.* **23**, 160-161 (1973).
- ³⁴ Pietrangelo, A., Borella, F., Casalgrandi, G.: Antioxidant activity of silybin *in vivo* during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology* **109**, 1941-1949 (1995).

- ³⁵ Baer-Dubowska, W., Szafer, H., Krajka-Kuzniak, V.: Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica* **28**, 735-743 (1998).
- ³⁶ Fiebrich, F., Koch, H.: Silymarin, an inhibitor of lipoxygenase. *Experientia* **35**, 1548-1560 (1979).
- ³⁷ Boigk, G., Stroedter, L., Herbst, H.: Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology* **26**, 643-649 (1997).
- ³⁸ Afaq, F., Adhami, V. M., Ahmad, N., Mukhtar, H.: Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Front. Biosci.* **7**, 784-792 (2002).
- ³⁹ Katiyar, S. K.: Silymarin and skin cancer prevention: Anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. *Int. J. Oncol.* **26**, 169-176 (2005).
- ⁴⁰ Dorai, T., Aggarwal, B. B.: Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett.* **215**, 129-140 (2004).
- ⁴¹ Vinh, P. Q., Sugie, S., Tanaka, T., Hara, A., Yamada, Y., Katayama, M., Deguchi, T., Mori, H.: Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Jpn. J. Cancer Res.* **93**, 42-49 (2002).
- ⁴² Kohno, H., Tanaka, T., Kawabata, K., Hirose, I., Sugie, S., Tsuda, H., Mori, H.: Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Int. J. Cancer* **101**, 461-468 (2002).
- ⁴³ Singh, R. P., Agarwal, R.: Prostate cancer chemoprevention by silibinin: Bench to bedside. *Mol. Carcinogen.* **45**, 436-442 (2006).
- ⁴⁴ Šimánek, V., Křen, V., Ulrichová, J., Vičar, J., Cvak, L.: Silymarin: What is in the name? *Hepatology* **32**, 442-443 (2000).
- ⁴⁵ Jacobs, B. P., Dennehy, C., Ramirez, G., Sapp, J., Lawrence, V. A.: Milk thistle for the treatment of liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med.* **113**, 506-515 (2002).
- ⁴⁶ Weyhenmeyer, R., Mascher, H., Birkmayer, J.: Study on dose-linearity of the pharmacokinetics of silibinin diastereomers using a new stereospecific assay. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **30**, 134-138 (1992).
- ⁴⁷ Li, W., Han, J., Li, Z. N., Li, X., Zhou, S., Liu, C.: Preparative chromatographic purification of diastereomers of silybin and their quantification in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B* **862**, 51-57 (2008).
- ⁴⁸ Graf, T. N., Wani, M. C., Agarwal, R., Kroll, D. J., Oberlies, N. H.: Gram-Scale purification of flavonolignan diastereoisomers from *Silybum marianum* (Milk Thistle) extract in support of preclinical *in vivo* studies for prostate cancer chemoprevention. *Planta Med.* **73**, 1495-1501 (2007).
- ⁴⁹ Křen, V., Gažák, R., Purchartová, K., Marhol, P., Biedermann, D., Sedmera, P.: Chemoenzymatic preparative separation of silybins A and B. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **61**, 247-251 (2009).
- ⁵⁰ Kодиček, M.: *Hydrolasy. Z Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online] Praha: VŠCHT Praha, 2007 staženo [2010-01-06].
- ⁵¹ Muralidhar, R.V., Chirumamilla, R. R., Marchant, R., Ramachandran, V. N., Ward, O. P., Nigam, P.: Understanding lipase stereoselectivity. *Word J. Mikrob. Biot.* **18**, 81-97 (2002).
- ⁵² Sinnott, L. M.: Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202 (1990).

- ⁵³ Boss, W., Lehmann, J., Wallenfels, K.: Asymmetrischer galaktosyltransfer auf glycerin mit β -galaktosidase aus *E. coli*. *Carbohydr. Res.* **1**, 419-420 (1966).
- ⁵⁴ Boss, W., Lehmann, J., Wallenfels, K.: Untersuchungen zur induktion der lac-enzyme: Teil III. Synthese radioaktiv markierter induktoren durch enzymatischen galaktosyltransfer und direkte enzymatische verknupfung von glycon und aglycon mit β -galaktosidase. *Carbohydr. Res.* **7**, 381-394 (1968).
- ⁵⁵ Boss, W.: Synthesis of (2*R*)-glycerol-O- β -D-galactopyranoside by β -galactosidase. *Methods Enzymol.* **89**, 59-64 (1982).
- ⁵⁶ Bjorkling, F., Godtfredsen, S. E.: New enzyme catalyzed synthesis of monoacyl galactoglycerides. *Tetrahedron* **44**, 2957-2962 (1988).
- ⁵⁷ Crout, D. H. G., MacManus, D. A., Critchley, P.: Enzymatic synthesis of glycosides using the β -galactosidase of *Escherichia coli*: regio- and stereo-chemical studies. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 1865-1868 (1990).
- ⁵⁸ Trincone, A., Nicolaus, B., Lama, L., Gambacorta, A.: Stereochemical studies of enzymatic transglycosylation using *Sulfolobus solfataricus*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 2841-2844 (1991).
- ⁵⁹ Huber, R. E., Gaunt, M. T., Hurlburt, K. L.: Binding and reactivity at the "glucose" site of galactosyl- β -galactosidase (*Escherichia coli*). *Arch. Biochem. Biophys.* **234**, 263-271 (1983).
- ⁶⁰ IUBMB (1992) *Enzyme nomenclature*, Academic Press, London.
- ⁶¹ Desnuelle, P.: The lipases. *The Enzymes* **7**, 575-616 (1972).
- ⁶² Ghanem, A.: Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* **63**, 1721-1754 (2007).
- ⁶³ Moss, G. P.: Basic terminology of stereochemistry. *Pure Appl. Chem.* **68**, 2193-2222 (1996).
- ⁶⁴ Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C. J.: Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294-7299 (1982).
- ⁶⁵ Drauz, K., Waldmann, H.: *Enzyme catalysis in organic synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
- ⁶⁶ Sakai, T., Kawabata, I., Kishimoto, T., Ema, T., Utaka, M.: Enhancement of the enantioselectivity in lipase-catalyzed kinetic resolutions of 3-phenyl-2*H*-azirine-2-methanol by lowering the temperature to -40°C. *J. Org. Chem.* **62**, 4906-4907 (1997).
- ⁶⁷ Sakai, T.: Low-temperature method for a dramatic improvement in enantioselectivity in lipase-catalyzed reactions. *Tetrahedron: Asymmetry* **15**, 2749-2756 (2004).
- ⁶⁸ Sakai, T., Liu, Y., Ohta, H., Korenaga, T., Ema, T.: Lipase-Catalyzed resolution of (2*R**,3*S**)- and (2*R**,3*R**)-3-methyl-3-phenyl-2-aziridinemethanol at low temperatures and determination of the absolute configurations of the four stereoisomers. *J. Org. Chem.* **70**, 1369-1375 (2005).
- ⁶⁹ Christoffers, J., Werner, T., Frey, W., Baro, A.: Straightforward Synthesis of (R)-(-)-Kjellmanianone. *Eur. J. Chem.* **10**, 1042-1045 (2004).
- ⁷⁰ Roberston, D. E., Bornscheuer, U. T.: Biocatalysis and biotransformation: New technologies, enzymes and challenges. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 164-165 (2005).
- ⁷¹ Lutz, S.: Engineering lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry* **15**, 2743-2748 (2004).

- ⁷² Chaubey, A., Parshad, R., Koul, S., Taneja, S. C., Qazi, G. N.: Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthrobacter* sp. lipase: kinetic resolution of fluoxetine intermediate. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **42**, 39–44 (2006).
- ⁷³ Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M.: Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (\pm)- α -hydroxy-phenylacetic acid derivatives. *Tetrahedron Asymmetry* **13**, 1337–1345 (2002).
- ⁷⁴ Palomo, J. M., Filice, M., Fernandez-Lafuente, R., Terreni, M., Guisan, J. M.: Regioselective hydrolysis of different peracetylated β -monosaccharides by immobilized lipases from different sources: key role of the immobilization. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1969–1976 (2007).
- ⁷⁵ Nakamura, Y., Matsumoto, T., Nomoto, F., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A.: Enhancement of activity of lipase-displaying yeast cells and their application to optical resolution of (R,S)-1-benzyloxy-3-chloro-2-propyl monosuccinate. *Biotechnol. Progr.* **22**, 998–1002 (2006).
- ⁷⁶ Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M., Fernández-Lafuente, R.: Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1119–1127 (2007).
- ⁷⁷ Ueji, S., Ueda, A., Tanaka, H., Watanabe, K., Okamoto, T., Ebara, Y.: Chemical modification of lipases with various hydrophobic groups improves their enantioselectivity in hydrolytic reactions. *Biotechnol. Lett.* **25**, 83–87 (2003).
- ⁷⁸ Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J. M., Guisan, J. M.: Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification. *Process Biochem.* **44**, 226–231 (2009).
- ⁷⁹ Hoare, D.G., Koshland, D. E.: A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J. Biol. Chem.* **242**, 2447–2453 (1967).
- ⁸⁰ Bianchi, D., Battistel, E., Bosetti, A., Cesit, P., Felkete, Z.: Effects of chemical modification on stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase. *Tetrahedron: Asymmetry* **4**, 777–782 (1993).
- ⁸¹ Monti, D., Gažák, R., Marhol, P., Biedermann, D., Purchartová, K., Fedrigo, M., Riva, S., Křen, V.: Enzymatic kinetic resolution of silybin diastereoisomers. *J. Nat. Prod, v tisku*, (DOI: 10.1021/np900758d).
- ⁸² Gao, C., Mayon, P., MacManus, D. A., Vulfson, E. N.: Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotechnol. Bioeng.* **71**, 235–243 (2001).
- ⁸³ Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, Ch., Engasser, J.-M., Ghoul, M.: Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 9496–9502 (2007).
- ⁸⁴ Ardhaoui, M., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Moussou, P., Pauly, G., Ghoul, M.: Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **29**, 63–67 (2004).
- ⁸⁵ Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H., Kolisis, F. N.: Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **21**, 59–62 (2003).
- ⁸⁶ Kartha, K. P. R., Field, R. A.: Iodine: A Versatile reagent in carbohydrate chemistry IV. Per-O-acetylation, regioselective acylation and acetolysis I. *Tetrahedron* **53**, 11753–11766 (1997).
- ⁸⁷ Pelter, A., Hänsel, R.: Struktur des Silybins: I. Abbauversuche. *Chem. Ber.* **108**, 790–802 (1975).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]